



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월16일  
(11) 등록번호 10-1848945  
(24) 등록일자 2018년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7030708  
(22) 출원일자(국제) 2011년04월25일  
심사청구일자 2016년04월25일  
(85) 번역문제출일자 2012년11월23일  
(65) 공개번호 10-2013-0098869  
(43) 공개일자 2013년09월05일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/056509  
(87) 국제공개번호 WO 2011/134921  
국제공개일자 2011년11월03일  
(30) 우선권주장  
61/327,837 2010년04월26일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US06048728 A\*  
US20030087372 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
노파르티스 아게  
스위스 4002 바젤  
(72) 발명자  
부다흐, 볼프강, 에른스트, 구스타프  
스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파  
마 아게  
샤쟁, 엘렌느, 켄.  
스위스 체하-4056 바젤 파티오스트라쎄 29  
도르쉬, 커스틴  
스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파  
마 아게  
(74) 대리인  
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 개선된 세포 배양 배지

(57) 요약

염화콜린 함량이 높은 세포 배양 배지가 제공된다. 이러한 세포 배양 배지는 추가로 중간 정도의 양으로만 아미노산을 포함하고, 특히 세포 배양 배지 내의 글루타민의 양이 제한된다. 이러한 세포 배양 배지는 세포 배양물을 사용하는 폴리펩티드의 대규모 생산에 사용될 수 있다. 염화콜린 함량이 높은 세포 배양 배지는 유가식(fed-batch) 세포 배양에 특히 적절하여, 이에 의해 세포 생존율이 더 긴 시간 동안 더 높은 수준에서 지속되고, 제한된 양의 아미노산이 사용됨에도 불구하고 폴리펩티드 역가가 높다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

220 내지 2500 mg/ℓ의 염화콜린 또는 등가량의 또 다른 콜린 염 및 500 내지 1400 mg/ℓ 농도의 글루타민을 포함하는 무혈청 및 무단백질 세포 배양 배지에서 재조합 CHO 세포를 배양하고 재조합 폴리펩티드를 발현시키는, CHO 세포 배양 시스템을 사용하는 재조합 발현에 의한 폴리펩티드의 생산 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 세포 배양 배지가 900 내지 1200 mg/ℓ 농도의 글루타민을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포가 유가식(fed-batch) 방법으로 배양되는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 대규모 생산 방법인 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 생산된 폴리펩티드가 번역후 변형되는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 폴리펩티드가 재조합 항체인 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포 배양 배지가 mmol/ℓ로 표현된 하기 농도의 하기 아미노산을 포함하는 것인 방법.

아르기닌	4.0 - 6.0
아스파라긴	3.0 - 6.0
아스파르트산	2.5 - 4.0
글리신	0.3 - 0.8
히스티딘	0.6 - 1.0
이소류신	2.0 - 5.0
류신	3.0 - 7.0
리신	2.0 - 4.0
메티오닌	1.0 - 1.5
페닐알라닌	1.0 - 2.0
프롤린	2.5 - 6.0
세린	3.0 - 8.0
트레오닌	2.0 - 3.5
트립토판	0.4 - 1.0
발린	2.5 - 5.0
티로신	1.0 - 2.0
시스틴	0.5 - 1.0

## 청구항 8

삭제

## 청구항 9

삭제

## 청구항 10

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### [발명의 기술 분야]

본 발명은 일반적인 생물공학 분야, 특히 세포 배양, 및 산업적 규모의 폴리펩티드 생산을 위한 그의 용도에 관한 것이다.

본 발명은 장기간에 걸친 세포 생존율이 높은 세포의 배양을 허용하는, 염화콜린 함량이 높은 세포 배양 배지를 제공한다. 추가로 본 발명에 따른 세포 배양 배지는, 특히 산업적 규모에서, CHO 세포 배양 시스템을 사용하는 폴리펩티드의 재조합 발현에 의한 폴리펩티드 생산에 사용되는 경우 높은 폴리펩티드 생산성 및/또는 개선된 생성물 품질을 수득하는 것을 허용한다.

### 배경 기술

#### [발명의 기술적 배경]

재조합 기술을 사용하는 폴리펩티드 제조는 지난 몇십 년 동안 표준 절차로 발전되었다. 각각의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝한 후, 이어서 적절한 발현 숙주를 발현될 유전자로 형질전환시키고, 최종적으로 재조합 폴리펩티드 생성물을 생산하고, 수득된 재조합 폴리펩티드 생성물을 정제하는 것에 의한 재조합 폴리펩티드의 입수는 완전히 새로운 부류의 생물학적으로 디자인 및 생산된 치료학에 대한 접근을 제공하였다.

제약상 활성인 화합물들이 재조합 DNA 기술에 이어지는 생물공학 분야에서 개발된 생산 방법을 사용하여 제약 산업에서 점점 더 많이 제조되었다.

이같은 생물학적 생성물에는 모노클로날 항체가 포함되고, 이는 자가면역 질환, 염증성 장애, 면역억제, 종양학 등이 포함되는 다양한 의학 분야에서 중요한 치료 선택사항으로 개발되었다.

생물학적 기원의 이같은 치료학의 발달은 산업적 규모의 생산을 필요로 하고, 이에 의해 대량의 재조합 폴리펩티드의 입수를 제공한다. 바람직한 발현 시스템은 곤충 세포, 효모 등을 기초로 하는 대부분의 다른 진핵생물 시스템 또는 심지어 전통적인 원핵생물 발현 시스템보다 우월한 포유동물 세포 배양이다.

그러나, 포유동물 세포 배양은, 특히 산업적 규모에서, 거대한 난제를 포함한다. 포유동물 세포 배양을 위한 생산 설비는 다수의 공정 조건의 면밀한 최적화를 필요로 한다.

전체적인 생산 공정을 제어하기 위한 가장 중요한 공정 파라미터 중 하나는 세포가 성장되는 배지이다. 적절한 세포 배양 배지는 세포 배양물에 모든 필요한 영양소를 제공하여야 하고, 이는 동물 기원의 성분, 예컨대 혈청 또는 단백질, 예를 들어 성장 인자가 배지에 첨가되지 않는 경우에 특히 어렵다.

추가로, 포유동물 세포 배양물은 폴리펩티드 생산 공정의 상이한 단계들에서 특별한 보충 성분을 필요로 한다. 따라서, a) 더 낮은 밀도에서의 숙주 세포의 초기 성장 및 증식; b) 이어지는 세포의 높은 밀도로의 배양; c) 배양된 세포에서의 실제 폴리펩티드 형성 공정 동안, 세포 배양 배지가 필요한 물질을 제공하여야 한다.

재조합 폴리펩티드의 생산을 위한 전체적인 공정은 바람직하게는 확장기 및 생산기를 포함한다. 확장기 동안에는, 나중에 후속 폴리펩티드 생산을 최대화하기 위해 성장 배지를 사용함으로써 숙주 세포가 높은 밀도로 배양된다. 생산기 동안에는, 생산 배지의 사용에 의해 원하는 폴리펩티드가 대량으로 실제로 형성된다. 전체적인 폴리펩티드 생산 공정의 각각의 기에서 세포의 특이적인 대사 요건을 충족시키기 위해, 상이한 배지 조성이 확

장기 및 생산기 각각에 대해 디자인되었다. 예를 들어, 생산 배지는 종종 성장 배지보다 더 높은 양의 아미노산을 함유한다.

- [0013] 따라서, 폴리펩티드의 대규모 생산을 위한 용도에 대한 특수한 중점이 있는 세포 배양 배지를 개발하기 위해 종래에 상당한 노력이 들었다. 그럼에도 불구하고, 생성물 품질 및 정량적 수율의 관점에서 폴리펩티드 생산을 추가로 최대화하기 위해 세포 배양 배지의 지속적인 개선이 여전히 중요한 목표이다.
- [0014] 세포 배양 배지의 다수의 성분이 폴리펩티드 생산을 위한 그의 역할의 관점에서 종래에 연구되었다. 가능한 표적은 무기 염, 아미노산, 탄소 공급원 예컨대 글루코스, 또는 비타민이다.
- [0015] 예를 들어, 비타민, 엽화콜린 또는 아미노산과 같은 화합물의 보충이 단백질이 없는 조건 하에서 배양된 세포의 생존율 및 생산성을 증가시킬 수 있는 것으로 실현되었다 (문헌 [Kim do Y et al., Cytotechnology 2005, 47, 37-49]).
- [0016] 엽화콜린은 세포에 대한 인지질 전구체로서 작용하는 세포 배양 배지의 표준 성분이다. 세포에 의해 흡수 및 프로세싱된 후, 마지막에는 이는, 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜이노시톨에 더하여, 포스파티딜 콜린으로 칭해지는 세포막 내의 주요 인지질 중 하나가 된다.
- [0017] 통상적으로 사용되는 세포 배양 배지 예컨대 D-MEM (둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)) 및 D-MEM/F-12가 광범위한 포유동물 세포주의 성장을 위해 널리 사용되었다. 이러한 배지들은 각각 4 mg/ℓ 및 8.98 mg/ℓ 양의 엽화콜린을 포함한다.
- [0018] 기타 상업적으로 입수가 가능한 배지 예컨대 햄(Ham) F-12 (바이오컨셉트(BioConcept)에서 상업적으로 입수가 가능함) 및 MEM (하이클론(HyClone)에서 상업적으로 입수가 가능함) 또한 각각 13.96 mg/ℓ 및 56 mg/ℓ의 낮은 양의 엽화콜린을 포함한다.
- [0019] US 6,180,401은 동물 세포 배양에서 폴리펩티드를 생산하기 위한 개선된 방법을 개시한다. 한 목표는 최종 생성물 농도를 증가시키는 것이다. 글루코스 농도, 오스몰랄농도 및 글루타민 농도가 포함되는 여러 파라미터가 생산기에서 생성물 수율을 최대화하기 위해 변형된다. US 6,180,401은 엽화콜린 함량이 50.86 mg/ℓ인 세포 배양 배지를 개시한다.
- [0020] US 5,122,469는 다양한 포유동물 세포주, 특히 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO)를 번식시키기 위한 배양 배지를 개시하고, 포유동물 세포의 소규모 및 대규모 번식에 적절한 현탁액에서의 또는 단층으로서의 높은 밀도의 세포 배양을 허용한다. 한 추가적인 이점은 강화된 생성물 수율이다. 이러한 배지는 특정 아미노산을 상승된 수준으로 함유하는 화학적으로 규정되는 배양 배지이다. 엽화콜린의 함량은 50.86 mg/ℓ이다.
- [0021] 엽화콜린 함량이 높은 배지로는 매우 소수만이 종래 기술에 공지되어 있다. 웨이머스(Waymouth)는 마우스 L929 섬유모세포 결합 조직 세포주의 배양에 사용될 수 있는 세포 배양 배지를 기술하였다 (문헌 [C. Waymouth, J. Natl. Cancer. Inst., 1959, 22, 1003-1017]). 이러한 배지는 화학적으로 규정되는 무혈청 합성 배지이고, 엽화콜린 함량이 250 mg/ℓ이다. 이러한 배지는 웨이머스 배지(Waymouth's Medium) MB 752/1 (바이오컨셉트 및 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))라는 명칭 하에 상업적으로 입수가 가능하다. 공지된 적용가능성은 전체 기관 배양, 흉막 삼출액으로부터의 암종 세포주의 확립, 및 잠재적으로 종양발생성인 세포의 그의 생체 내에서의 평가전의 성장에 제한된다.
- [0022] WO 02/101019는 각각 101.72 mg/ℓ 및 209.40 mg/ℓ로 엽화콜린 함량이 비교적 높은 2가지 배지 조성물을 개시한다. 이러한 배지들은 재조합 단백질 생산에 대한 글루타민 및 글루타메이트의 영향을 연구하는데 사용되었다. 그러나, 두 배지 모두가 높은 양의 글루타민을 여전히 함유하였다.
- [0023] 폴리펩티드 생산을 위한 세포 배양 배지 내의 엽화콜린 함량의 역할에 관한 한 종래 기술로부터 제한된 정보만이 이용가능하다. US 6,048,728에, 하이브리도마 세포를 사용하는 생물학적 생성물의 생산을 위한 세포 배양 배지 내의 엽화콜린 함량의 역할이 간략하게 논의되어 있다. 항체를 발현하는 세포의 경우에, 최대량의 항체의 분비가 1차 보충물의 다른 시약과 조합하여 4 mg/ℓ 초과, 바람직하게는 약 4 내지 75 mg/ℓ의 콜린 보충물을 함유하는 배지에서 관찰되었다. 이러한 농도에서, 콜린은 제한적이지 않고 명백한 독성이 없는 것으로 기술된다.
- [0024] 생산용 세포 배양 배지, 특히 재조합 폴리펩티드의 산업적인 대규모 생산에서 사용하기 위해 디자인된 것은 증가된 양의 성분, 예를 들어 아미노산을 필요로 한다.

- [0025] 그러나, 고도로 농축된 세포 배양 배지는 선택된 배지 성분의 제한된 용해도를 나타낸다. 대규모 생산을 위한 고도로 농축된 배지는, 예를 들어 생산기 동안, 그리고 특히 보관 동안, 개별적인 성분의 침전 위험이 있기 때문에, 제한된 용해도는 기술적인 불리함을 나타낸다. 이는 배지 조성의 변동, 및 생성물 형성의 임계점에서의 세포 배양 조건의 악화에 이를 수 있다.
- [0026] 추가적인 결과로서, 침전은 귀중한 배지 성분이 실제 생산 공정으로부터 유효하게 제거되는 것에 이른다. 이같은 단점을 극복하기 위해 디자인된 추가적인 재활용 공정은 기술적으로 실현되기 어렵고, 자원 및 시간 면에서 추가적인 노력을 필요로 한다. 덜 농축된 세포 배양 배지는, 폴리펩티드 생산에서 동등하게 효과적인데, 산업적 생산 공정에서 유의한 비용 감소를 달성하게 할 것이다.
- [0027] 상기 난제들 및 기존의 불리함을 고려하여, 심지어 더 높은 수율, 즉 개선된 특이적 및 전체적 생산성, 및 증가된 생성물 품질로 산업적 규모에서 재조합 폴리펩티드가 생산되게 하는 개선된 배양 배지가 산업적 생물공학 분야에서 계속 요구된다. 개선된 세포 배양 배지는 생산기 동안의 생산성의 개선에 특히 바람직하다.
- [0028] 폴리펩티드의 생산 방법의 특정한 기술적 목표는, 특히 생산 시간의 연장으로 인해, 폴리펩티드의 최종 수율을 최대화하기 위해 생산 공정의 말기에 더 높은 세포 생존율을 유지하는 것이다. 또한, 형성된 재조합 폴리펩티드의 응집을 감소시키는 것, 및 개선된 생성물 품질 (특히 번역후 변형, 예컨대 글리코실화 패턴의 관점에서)이 또한 중요한 기술적 목표이다.
- [0029] 마지막으로, 세포 성장, 폴리펩티드 생산성, 재조합 폴리펩티드 품질 및 폴리펩티드 기능성의 관점에서 동등하게 효과적이거나 심지어 더 양호하면서 성분들을 감소된 양으로 함유하는, 폴리펩티드의 대규모 생산을 위한 개선된 배양 배지가 바람직하다.

## 발명의 내용

### [발명의 개요]

- [0030] [발명의 개요]
- [0031] 상기 언급된 기술적인 난제들을 다루기 위해, 본 발명은 염화콜린 함량이 높은 세포 배양 배지를 제공하고, 이는, 특히 생물공학적 생산 공정의 후기 단계들에서, 세포 특이적 생산성 및 세포 생존율의 예기치 않은 개선에 이른다. 추가로, 이러한 세포 배양 배지의 사용에 의한 재조합 생성물의 품질이 또한 놀랍게도 개선될 수 있다. 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 생산기 동안 사용하기에 특히 적절하다. 따라서, 본 발명은 CHO 세포로부터 재조합 폴리펩티드를 생산할 수 있게 한다.
- [0032] 이러한 세포 배양 배지는 생산기 동안 높은 세포 성장, 높은 생존 세포 밀도 및 높은 폴리펩티드 역가를 달성하기 위해 배양 배지로서 특히 사용될 수 있다. 재조합 생성물의 더 적은 응집 및/또는 더 양호한 번역후 변형, 예컨대 개선된 글리코실화 패턴의 관점에서의 생성물 품질이 본 발명에 따른 세포 배양 배지의 사용에 의해 개선될 수 있다는 것이 또한 발견된다.
- [0033] 본 발명에서, 염화콜린이 바람직하게 사용된다. 그러나, 기타 콜린 공급원, 예를 들어, 수산화콜린, 타르타르산/비타르타르산콜린, 황산콜린, 인산콜린 또는 상이한 반대이온의 사용을 기초로 하는 임의의 기타 콜린 화합물이 본 발명에 따른 세포 배양 배지에서 사용하기에 또한 적절하다. 이같은 기타 콜린 화합물이 사용되는 경우, 바람직하게는 그의 양은 상기에서 제공된 농도 범위 및 값의 염화콜린을 사용함으로써 달성되는 바와 동일한 콜린 몰 농도를 달성하도록 선택되고, 즉 바람직하게는 기타 콜린 염은 개요된 바와 같은 염화콜린의 농도와 등가인 농도로 존재한다. 이는 하기에 언급되는 특정한 측면들 및 실시양태들에 대해 또한 유효하다.
- [0034] 본 발명의 첫 번째 측면에 따르면, 염화콜린 함량이 60 mg/ℓ 내지 2500 mg/ℓ 범위인 세포 배양 배지가 제공된다. 세포 배양 배지 내의 염화콜린 함량은 80 mg/ℓ 이상, 별법적으로는 160 mg/ℓ 이상, 200 mg/ℓ 이상 또는 220 mg/ℓ 이상일 수 있다. 세포 배양 배지 내의 염화콜린 함량은 2500 mg/ℓ, 별법적으로는 1000 mg/ℓ, 840 mg/ℓ, 500 mg/ℓ 또는 300 mg/ℓ 으로 제한된다. 염화콜린은 약 240 mg/ℓ 의 농도로 존재할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 세포 배양 배지는 20 내지 57 mmol/ℓ 의 총 아미노산 농도로 표현되는 제한된 함량으로만 아미노산을 추가로 포함한다. 별법적으로, 총 아미노산 농도는 25 mmol/ℓ 초과, 30 mmol/ℓ 초과, 35 mmol/ℓ 초과 또는 심지어 40 mmol/ℓ 초과이다. 추가로, 총 아미노산 농도는 54 mmol/ℓ 미만일 수 있다. 총 아미노산 농도는 예를 들어 약 51 mmol/ℓ 일 수 있다.
- [0036] 추가로, 세포 배양 배지는 임의로 글루타민을 감소된 함량으로 포함한다. 특히, 글루타민은 500 내지 1400 mg/ℓ, 별법적으로는 800 내지 1400 mg/ℓ, 또는 심지어 900 내지 1200 mg/ℓ 의 농도로 존재한다.

[0037] 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 세포 배양 배지 내의 아미노산 함량은, 임의로, mmol/ℓ 로 표현된 하기 농도의 하기 아미노산을 포함할 수 있다:

아르기닌	4.0 – 6.0, 바람직하게는 4.5 – 5.5
아스파라긴	3.0 – 6.0, 바람직하게는 4.0 – 5.5
아스파르트산	2.5 – 4.0, 바람직하게는 3.0 – 3.6
글리신	0.3 – 0.8, 바람직하게는 0.5 – 0.7
히스티딘	0.6 – 1.0, 바람직하게는 0.7 – 0.9
이소류신	2.0 – 5.0, 바람직하게는 3.0 – 4.0
류신	3.0 – 7.0, 바람직하게는 3.5 – 6.0
리신	2.0 – 4.0, 바람직하게는 2.5 – 3.5
메티오닌	1.0 – 1.5, 바람직하게는 1.2 – 1.4
페닐알라닌	1.0 – 2.0, 바람직하게는 1.3 – 1.8
프롤린	2.5 – 6.0, 바람직하게는 3.0 – 5.5
세린	3.0 – 8.0, 바람직하게는 4.0 – 7.0
트레오닌	2.0 – 3.5, 바람직하게는 2.5 – 3.1
트립토판	0.4 – 1.0, 바람직하게는 0.5 – 0.8
발린	2.5 – 5.0, 바람직하게는 3.0 – 4.5
티로신	1.0 – 2.0, 바람직하게는 1.2 – 1.8
시스틴	0.5 – 1.0, 바람직하게는 0.6 – 0.8

[0038]

[0039] 이러한 세포 배양 배지는 바람직하게는 무혈청 및 무단백질이다. 바람직하게는, 이는 단백질 가수분해물이 또한 없다.

[0040] 본 발명의 두 번째 측면에 따르면, 재조합 CHO 세포를 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 세포 배양 배지에서 배양하는, 생산기를 포함하는 재조합 폴리펩티드의 생산 방법이 제공된다.

[0041] 제조된 재조합 폴리펩티드는 특히 재조합 항체이다.

[0042] 본 발명의 방법에서, 세포는 바람직하게는 유가식(fed-batch) 방법으로 배양된다.

## 도면의 간단한 설명

[0043] [도면의 간단한 설명]

도 1 내지 도 8에서, 3가지 배지는 저-콜린 성장 배지 (◆ (다이아몬드); 대조군 1), 생산 배지 (▲ (삼각형); 대조군 2) 및 고-콜린 성장 배지, 즉 200 mg/ℓ 염화콜린의 추가량이 보충된 저-콜린 성장 배지 (■ (사각형))이다.

도 1은 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 진탕 플라스크에서 배양된 mAb1을 발현하는 세포의 표준화된 생존 세포 밀도를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 1).

도 2는 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 진탕 플라스크에서 배양된 mAb1을 발현하는 세포의 생존율을 시간의 함수로서 도시한다 (실험 1).

도 3은 3가지 상이한 배지에 대해 진탕 플라스크에서 mAb1을 발현하는 세포의 배양 후에 수득된 표준화된 폴리펩티드 역가를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 1).

도 4는 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 진탕 플라스크에서 배양된 mAb2를 발현하는 세포의 표준화된 생존 세포 밀도를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 2).

도 5는 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 진탕 플라스크에서 배양된 mAb2를 발현하는 세포의 생존율을 시간의 함수로서 도시한다 (실험 2).

도 6은 3가지 상이한 배지에 대해 진탕 플라스크에서 mAb2를 발현하는 세포의 배양 후에 수득된 표준화된 폴리펩티드 역가를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 2).

도 7은 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 진탕 플라스크에서 배양된 mAb3을 발현하는 세포의 표준화된 생존 세



포 밀도를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 3).

도 8은 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 진탕 플라스크에서 배양된 mAb3을 발현하는 세포의 생존율을 시간의 함수로서 도시한다 (실험 3).

도 9는 3가지 상이한 배지에 대해 진탕 플라스크에서 mAb3을 발현하는 세포의 배양 후에 수득된 표준화된 폴리펩티드 역가를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 3).

도 10은 진탕 플라스크에서의 7일 배양 후에 생산된 mAb3의 응집율을 도시한다. 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)로 응집율을 측정한다. 오차 막대는 3개의 생물학적 복제본의 표준 편차이다.

도 11은 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 생물반응기에서 유가식 실행으로 배양된 mAb3을 발현하는 세포의 표준화된 생존 세포 밀도를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 4).

도 12는 3가지 상이한 세포 배양 배지에서 생물반응기에서 유가식 실행으로 배양된 mAb3을 발현하는 세포의 생존율을 시간의 함수로서 도시한다 (실험 4).

도 13은 3가지 상이한 배지를 사용하여 생물반응기에서 유가식 실행으로 mAb3을 발현하는 세포를 사용하여 수득된 표준화된 폴리펩티드 역가를 시간의 함수로서 도시한다 (실험 4).

도 14는 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 13일의 세포 배양 후에 수득된 표준화된 mAb3 항체 역가를 도시한다.

도 15는 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 세포 배양 제13일의 mAb3을 발현하는 세포의 생존율을 도시한다.

도 16은 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제3일 (100%)에 시작하여 제13일까지의 mAb3을 발현하는 세포의 표준화된 생존 세포 밀도를 도시한다.

도 17은 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제3일에 시작하여 제13일까지의 mAb3을 발현하는 세포의 생존율을 도시한다.

도 18은 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하는 배양의 제3일에 시작하여 제13일까지의 표준화된 mAb3 항체 역가 발달을 도시한다.

도 19는 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제0일에 시작하여 제17일까지의 mAb4를 발현하는 세포의 표준화된 생존 세포 밀도를 도시한다.

도 20은 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제0일에 시작하여 제17일까지의 mAb4를 발현하는 세포의 생존율을 도시한다.

도 21은 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제17일의 mAb4를 발현하는 세포의 생존율을 도시한다.

도 22는 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제7일에 시작하여 제17일까지의 표준화된 mAb4 항체 역가를 도시한다.

도 23은 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-콜린 성장 배지를 사용하여 제17일의 표준화된 mAb4 항체 농도를 도시한다.

도 24는 다양한 농도의 염화콜린이 보충된 저-염화콜린 성장 배지를 사용하여 17일의 세포 배양에서 수득된 mAb4를 발현하는 세포의 표준화된 평균 세포 특이적 생산성 (qP)을 도시한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [발명의 상세한 설명]

세포 배양 및 이어지는 이러한 세포 배양물로부터의 폴리펩티드 생산에 사용되는 통상적인 세포 배양 배지는 낮은 양의 염화콜린만을 함유한다. 종래 기술에 기술된 매우 소수의 세포 배양 배지만이 중간 정도이거나 또는 심지어 높은 양의 염화콜린을 함유한다. 그러나, 이러한 배지들은 높은 양의 염화콜린이, 특히 생산기 동안 사용되는 경우에, 세포 특이적 생산성, 세포 성장 및 및 생성물 품질에 대해 지니는 역할의 관점에서 체계적으로 조사되지 않았다.

- [0046] 본 발명에 따르면, 염화콜린의 양이 더 낮은 배지와 비교하여 높은 양의 염화콜린을 포함하는 세포 배양 배지를 생산 배지로서 사용하여 CHO 세포를 배양하는 경우에 세포 특이적 생산성 (또는 폴리펩티드 발현)의 예기치 않은 개선이 관찰된다. 높은 양의 염화콜린이 보충된 경우의 성장 배지조차도, 놀랍게도, 생산기 동안 CHO 세포의 배양을 위한 효과적인 생산 배지로서 사용될 수 있고, 이에 의해 대량의 폴리펩티드, 바람직하게는 세포 배양물에서의 재조합 폴리펩티드 발현에 의해 수득되는 폴리펩티드가 수득된다는 것이 본원에서 실연된다.
- [0047] 염화콜린이 본 발명에 따라 바람직하게 사용되지만, 기타 콜린 공급원, 예를 들어, 수산화콜린, 타르타르산/비타르타르산콜린, 황산콜린, 인산콜린 또는 상이한 반대이온의 사용을 기초로 하는 모든 기타 콜린 화합물이 본 발명에 따른 세포 배양 배지에서 사용하기에 또한 동등하게 적절하다.
- [0048] 본 발명에 따른 세포 배양 배지의 폴리펩티드 생산을 위한 용도는 폴리펩티드의 재조합 발현을 위한 CHO 세포의 배양을 일반적으로 수반한다. 세포 배양 배지가 폴리펩티드의 대규모 생산용으로 사용되는 것이 바람직하다. 폴리펩티드의 대규모 생산은 치료적으로 활성인 생물제약품의 제조에 사용되는 재조합 폴리펩티드의 산업적 생산에 전형적으로 요구되는 양에 관련된다. 500 ℓ 이상의 부피, 1000 ℓ 이상, 5000 ℓ 이상 또는 심지어 더 높은 부피의 세포 배양물이 전형적으로 대규모 생산 용도를 나타낸다.
- [0049] 폴리펩티드 생산에 사용되는 본 발명에 따른 세포 배양 배지 내의 염화콜린의 양은 기존에 사용된, 대규모의 폴리펩티드 생산에 사용되는 세포 배양 배지로부터 공지된 염화콜린 함량보다 유의하게 더 높다.
- [0050] 따라서, 본 발명은 높은 함량, 예컨대 60 mg/ℓ 이상, 80 mg/ℓ 이상, 160 mg/ℓ 이상, 200 mg/ℓ 이상 또는 심지어 220 mg/ℓ 이상의 염화콜린을 포함하는 CHO 세포를 사용하는 재조합 폴리펩티드 생산에 적절하다. 세포 배양 배지 내의 염화콜린의 함량은 2600 mg/ℓ, 1000 mg/ℓ, 840 mg/ℓ, 500 mg/ℓ 또는 심지어 300 mg/ℓ로 제한된다. 염화콜린은 약 240 mg/ℓ의 농도로 존재할 수 있다.
- [0051] 염화콜린 농도가 높을수록, 배지에 대한 비용이 더 높다. 따라서, 너무 높은 염화콜린 농도는 비용 관점에서 불리하다. 또한, 염화콜린 함량은 배지의 오스몰랄농도에 기여한다. 너무 높은 염화콜린 농도는 불리할 수 있는데, 이는 이러한 농도가, 다른 배지 성분과 함께, 원하는 것보다 높은 총 오스몰랄농도를 초래할 수 있기 때문이다. 특히 유가식 방법에서, 공급(feeding) 전략에 제한을 부과할 수 있기 때문에 너무 높은 출발 오스몰랄 농도를 사용하는 것이 바람직하지 않다.
- [0052] 상기 이유들로, 본 발명자들은 최적의 염화콜린 농도가 본원에 기재된 한계 내에 있는 것으로 생각한다.
- [0053] 염화콜린 이외의 콜린 화합물이 사용되는 경우, 이는 등가의 농도로 사용된다. 등가의 농도는 염화콜린이 상기 범위 내의 농도로 사용되는 경우에 달성되는 것과 동일한 범위 내인 콜린의 몰 농도가 달성되는 것을 의미한다.
- [0054] 본 발명의 첫 번째 측면에 따르면, 세포 배양 배지는 총 아미노산 농도로 표현되는 제한된 함량으로만 아미노산을 포함한다. 더욱 특히, 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 세포 배양 배지는 20 내지 57 mmol/ℓ의 총 아미노산 농도를 특징으로 한다. 총 아미노산 농도는 25 mmol/ℓ 초과, 30 mmol/ℓ 초과, 35 mmol/ℓ 초과 또는 심지어 40 mmol/ℓ 초과일 수 있다. 추가로, 총 아미노산 농도는 54 mmol/ℓ 미만일 수 있다. 총 아미노산 농도는 예를 들어 약 51 mmol/ℓ일 수 있다.
- [0055] 동시에, 염화콜린 농도는 상기 언급된 바와 같고, 즉 60 mg/ℓ 내지 2500 mg/ℓ의 범위이며, 이때 바람직한 범위 및 값 또한 상기 언급된 바와 같다.
- [0056] 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 세포 배양 배지는, 특히, 생산기 동안 높은 세포 성장, 높은 생존 세포 밀도 및 높은 폴리펩티드 역가를 달성하기 위해 생산 배지로서 사용될 수 있다. 추가로, 특히 더 적은 응집 및/또는 더 양호한 번역후 변형, 예컨대 개선된 글리코실화 패턴의 관점에서, 재조합 생성물의 더 높은 생성물 품질이 달성된다.
- [0057] 세포 배양물의 성장 및 생성된 폴리펩티드 생산성에 대한 아미노산 글루타민의 역할이 근년에 광범위하게 연구되었다. 글루타민이 폴리펩티드 합성을 위한 중요한 구성 요소일 뿐만 아니라 또한 포유동물 세포에 대한 1차 에너지 공급원을 나타낸다는 것이 발견되었다. 따라서, 높은 농도의 글루타민이 폴리펩티드 생산에 사용되는 세포 배양 배지 내에 일반적으로 포함되었다. 세포 배양 배지 내의 높은 양의 글루타민은, 특히 산업적 규모에서, 세포 성장 및 폴리펩티드 발현에 중요하다.
- [0058] 그럼에도 불구하고, 글루타민 대사는 글루타민의 분해 및 암모늄 이온의 축적을 초래하고, 이러한 이온은 세포 성장 및 폴리펩티드 생산에 독성인 부산물로 공지되어 있다. 따라서, 세포 배양물 내의 글루타민의 양을 제한하는 것이 바람직하다. 여러 글루타민 대체제, 예를 들어 글루탐산이 종래 기술에서 제안되었다. 그러나, 유



가식 방법에서 글루타민을 글루탐산으로 대체하는 것이 더 적은 부산물 형성에 이르지만 또한 더 낮은 생산성에 이른다는 것이 기술되었다 (문헌 [Doverskog et al., J. Biotechnol., 1997, 59, 103-115]). 따라서, 여전히 높은 세포 성장 및 폴리펩티드 생산성을 허용하면서 감소된 양의 글루타민을 함유하는 세포 배양 배지가 바람직하다.

[0059] 일부 공지된 배지와 비교하여 높은 양의 염화콜린의 첨가가, 특히 생산기 동안, 감소된 양의 글루타민을 포함하는 배지를 사용하는 것을 가능하게 하는 한편, 세포의 생산성은 여전히 크게 영향을 받지 않는다는 것이 발견되었다.

[0060] 따라서, 본 발명의 첫 번째 측면에 따라, 종래 기술로부터의 배지와 비교했을 때 유의하게 감소된 임의적인 양의 글루타민을 추가로 포함하는 세포 배양 배지가 제공된다. 이러한 세포 배양 배지는 또한 글루타민 대체제 예컨대 글루탐산 등이 없다. 이러한 세포 배양 배지는 500 내지 1400 mg/ℓ, 800 내지 1400 mg/ℓ, 또는 900 내지 1200 mg/ℓ의 농도로 글루타민을 임의로 포함한다.

[0061] 동시에, 염화콜린 농도는 상기 언급된 바와 같고, 즉 60 mg/ℓ 내지 2500 mg/ℓ의 범위이며, 이때 바람직한 범위 및 값 또한 상기 언급된 바와 같다. 추가로, 세포 배양 배지 내의 총 아미노산 농도는 동시에 20 내지 57 mmol/ℓ 이고, 이때 바람직한 범위 및 값 또한 상기 언급된 바와 같다.

[0062] 본 발명의 첫 번째 측면의 또 다른 임의적인 변형에 따르면, 개별적인 아미노산들의 각각의 양은 하기 정의된 바와 같다.

[0063] 아미노산들의 이같은 중간 정도의 양은 DMEM 또는 RPMI와 같은 통상적인 세포 배양 배지 내에 함유된 아미노산들의 양보다 여전히 더 높지만, 동시에, 대규모 생산에 사용되는 전형적인 생산 배지 내에 함유된 아미노산들의 양보다 유의하게 더 낮다.

[0064] 생산 배지 내의 증가된 양의 아미노산들은, 특히 폴리펩티드 생산이 더 큰 규모 또는 심지어 산업적 규모로 수행되는 경우에, 높은 생산성 및 높은 생성물 품질에 중요한 것으로 고려된다. 높은 양의 염화콜린의 존재가, 특히 생산기 동안 사용되는 세포 배양 배지에서, 개별적인 아미노산들의 양을 제한하는 것을 허용한다는 것이 이제 발견되었다.

[0065] 본 발명의 첫 번째 측면의 이러한 임의적인 변형에 따른 세포 배양 배지 내의 개별적인 아미노산들의 함량은 mmol/ℓ 로 표현된 하기 양의 하기 아미노산을 포함한다:

아르기닌	4.0 – 6.0, 바람직하게는 4.5 – 5.5
아스파라긴	3.0 – 6.0, 바람직하게는 4.0 – 5.5
아스파르트산	2.5 – 4.0, 바람직하게는 3.0 – 3.6
글리신	0.3 – 0.8, 바람직하게는 0.5 – 0.7
히스티딘	0.6 – 1.0, 바람직하게는 0.7 – 0.9
이소류신	2.0 – 5.0, 바람직하게는 3.0 – 4.0
류신	3.0 – 7.0, 바람직하게는 3.5 – 6.0
리신	2.0 – 4.0, 바람직하게는 2.5 – 3.5
메티오닌	1.0 – 1.5, 바람직하게는 1.2 – 1.4
페닐알라닌	1.0 – 2.0, 바람직하게는 1.3 – 1.8
프롤린	2.5 – 6.0, 바람직하게는 3.0 – 5.5
세린	3.0 – 8.0, 바람직하게는 4.0 – 7.0
트레오닌	2.0 – 3.5, 바람직하게는 2.5 – 3.1
트립토판	0.4 – 1.0, 바람직하게는 0.5 – 0.8
발린	2.5 – 5.0, 바람직하게는 3.0 – 4.5
글루타민	6.0 – 10.0, 바람직하게는 7.5 – 9.0
티로신	1.0 – 2.0, 바람직하게는 1.2 – 1.8
시스틴	0.5 – 1.0, 바람직하게는 0.6 – 0.8

[0066]

[0067] 동시에, 염화콜린 농도는 상기 언급된 바와 같고, 즉 60 mg/ℓ 내지 2500 mg/ℓ의 범위이며, 이때 바람직한 범위 및 값 또한 상기 언급된 바와 같다. 추가로, 세포 배양 배지 내의 총 아미노산 농도는 동시에 20 내지 57 mmol/ℓ 이고, 이때 바람직한 범위 및 값 또한 상기 언급된 바와 같다.

- [0068] 높은 염화콜린 함량으로 인해, 아미노산들의 각각의 양이 폴리펩티드의 대규모 생산에 사용되는 다른 세포 배양 배지에서 사용되는 양보다 유의하게 더 낮을 수 있다. 달리 말하면, 높은 양의 염화콜린의 첨가가 세포 성장, 세포 생존율 및 폴리펩티드 역가를 악화시키지 않으면서 아미노산 대부분의 양을 유의하게 감소시키는 것을 허용한다. 이는 포함된 아미노산 대부분의 농도가 더 낮은 세포 배양 배지가 사용될 수 있어, 이에 의해 덜 가공성인 세포 배양 배지 성분에 대한 침전 문제를 피할 수 있다는 기술적인 이점이 있다. 또한, 폴리펩티드 생성물의 전체적인 품질 및 수율은 영향을 받지 않거나 또는 심지어 개선될 수 있음에도 불구하고 세포 배양 배지에 관한 유의한 비용 감소가 달성된다. 하기에 기술된 바와 같이, 제조합 폴리펩티드 생성물의 응집이 본 발명에 따른 세포 배양 배지의 사용에 의해 감소될 수 있다. 추가적으로, 더 양호한 번역후 변형 예컨대 개선된 글리코실화 패턴 또는 기타 단백질 품질 속성 예컨대 제조합 폴리펩티드의 더 낮은 응집이 또한 획득되었다. 일부 경우에, 본 발명에 의해 개시된 바와 같은 세포 배양 배지의 변형은 심지어 세포 생존율 및 세포 성장, 뿐만 아니라 생성된 폴리펩티드 역가를 개선하는 것을 돕는다.
- [0069] 용어 "세포 배양 배지"는 장기간에 걸쳐 세포를 성장시키는데 사용될 수 있는 영양소들의 수용액을 지칭한다. 전형적으로, 세포 배양 배지는 하기의 성분들을 포함한다: 에너지 공급원 (일반적으로 탄수화물 화합물, 바람직하게는 글루코스일 것이다), 아미노산, 바람직하게는 기본적인 아미노산 세트 (모든 필수 및 비-필수 아미노산이 포함됨), 비타민 및/또는 기타 유기 화합물 (낮은 농도로 필요함), 유리 지방산, 및 미량 원소, 무기 염, 완충 화합물 및 뉴클레오타이드 및 염기를 포함하는 무기 화합물.
- [0070] 용어 "성장 배지"는 전체적인 생산 공정의 확장기 동안 일반적으로 사용되는 세포 배양 배지를 지칭한다. 확장은 높은 세포 성장 및 더 적은 폴리펩티드 생산을 주로 특징으로 하는, 전체적인 배양/생산 공정의 첫 번째 기간이다. 확장은 세포를 확장시키는 목적에 소용이 있고, 이는 생산 생물반응기에 접종하기 위한, 충분한 개수의 대수 성장기에 있는 세포를 생성시키는 것을 의미한다.
- [0071] 용어 "생산 배지"는 전체적인 생산 공정의 생산기 동안 일반적으로 사용되는 세포 배양 배지를 지칭한다. 생산기는 높은 양의 생성물을 생산하는 목적에 소용이 있는, 전체적인 배양/생산 공정의 두 번째 기이다. 생산기 동안, 세포는 가능한 한 오랫동안 생존적 및 생산적 방식으로 유지되어야 한다.
- [0072] 제약 산업 분야에서의 세포 배양 배지의 용도, 예를 들어, 치료적으로 활성인 제조합 폴리펩티드의 생산을 위한 용도는 안전성 및 오염 쟁점으로 인해 일반적으로 어떠한 동물 기원 물질의 사용도 허용하지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 바람직하게는 무혈청 및/또는 무단백질 배지이다. 용어 "무혈청 및/또는 무단백질 배지"는 조직 가수분해물, 소 태아 혈청 등과 같은 동물 공급원으로부터의 첨가물을 함유하지 않는 완전히 화학적으로 규정되는 배지를 나타낸다. 추가로, 단백질, 특히 성장 인자 예컨대 인슐린, 트랜스페린 등이 또한 바람직하게는 본 발명에 따른 세포 배양물에 첨가되지 않는다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 세포 배양 배지에 가수분해된 단백질 공급원 예컨대 대두, 밀 또는 쌀 펩톤 또는 효모 가수분해물 등이 또한 보충되지 않는다.
- [0073] 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 다양한 세포 배양 방법에서 사용될 수 있다. 세포 배양은 부착 배양으로, 예를 들어, 단층 배양으로, 또는 바람직하게는 현탁 배양으로 수행될 수 있다.
- [0074] 대규모 세포 배양은, 예를 들어, 산업적 생물공학에서 확립된 다양한 발효 방법에 의해 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포 배양 배지를 사용하여 불연속 및 연속 세포 배양 방법, 예컨대 관류 및 화학조절 배양장치(chemostat)를 이용할 수 있다. 반복 유가식 및 반복 회분식이 포함되는 불연속 방법이 한 바람직한 실시양태이다.
- [0075] 회분식 세포 배양은 유가식 배양 또는 단순 회분식 배양을 포함한다. 용어 "유가식 세포 배양"은 세포 및 세포 배양 배지가 초기에 배양 용기에 공급되고, 배양 종결 전에 주기적으로 세포 및/또는 생성물을 수확하면서 또는 수확하지 않으면서 배양 공정 동안 추가적인 배양 영양소가 연속적으로 또는 불연속적인 증분으로 배양물에 공급되는 세포 배양을 지칭한다. 용어 "단순 회분식 배양"은 배양 공정을 시작할 때 세포 및 세포 배양 배지가 포함되는 세포 배양을 위한 모든 성분이 배양 용기에 공급되는 절차에 관련된다.
- [0076] 본 발명에 따른 세포 배양 배지에서 배양되는 세포는 CHO 세포이다.
- [0077] 본 발명에 따른 세포 배양물 및 세포 배양 배지로부터 생산될 수 있는 폴리펩티드는 제한되지 않는다. 폴리펩티드는 제조합 폴리펩티드일 수 있거나 제조합 폴리펩티드가 아닐 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합으로 연결된 2개를 초과하는 아미노산의 사슬로 구성된 분자; 2개 이상의 이같은 사슬을 함유하는 분자; 예를 들어 글리코실화에 의해, 추가적으로 변형된 하나 이상의 이같은 사슬을 포함하는

분자를 포함한다. 용어 폴리펩티드는 단백질을 포함하도록 의도된다.

- [0078] 본 발명에 따른 세포 배양물 및 세포 배양 배지에 의해 생산되는 폴리펩티드의 바람직한 부류는 재조합 항체이다.
- [0079] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 나노바디(nanobody), 변형된 항체, 항체의 서브유닛, 항체 유도체, 인공 항체, 항체와 단백질의 조합물, 및 원하는 생물학적 활성을 나타내도록 충분히 긴 항체 단편을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 모노클로날 항체는 인간 항체일 수 있다.
- [0080] 그러나, 항체 이외의 폴리펩티드, 예를 들어 막형단 단백질, 수용체, 호르몬, 성장 인자, 프로테아제, 응고 및 항-응고 단백질, 억제제 단백질, 인터류킨, 운반 인자, 융합 단백질 등과 같은 폴리펩티드가 본 발명에 따른 세포 배양물 및 세포 배양 배지를 사용하여 또한 생산될 수 있다. 이러한 세포 배양 배지는 바이러스 생산에 또한 사용될 수 있다.
- [0081] 이같은 세포 배양 방법으로부터 수득된 생성물을 제약 제제의 제조용으로 사용할 수 있다. 용어 "제약 제제"는 포유동물, 특히 인간에게 투여하는데 적절하거나 이를 위해 적합화된 조성물을 가리킨다. 또한, 본 발명에 따른 단백질(들)은 생물학적으로 활성인 작용제의 다른 성분들 예컨대 제약상 허용되는 계면활성제, 부형제, 담체, 희석제 및 비히클과 함께 투여될 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 세포 배양 배지 내에 높은 양의 염화콜린은 존재하는 것은 높은 농도에서 세포의 성장을 지지하는 배지의 능력에 부정적으로 영향을 미치지 않으면서 세포 배양 배지 내의 아미노산 함량을 감소시키는 것을 허용하고, 동시에 높은 폴리펩티드 역가를 가능하게 한다. 이러한 효과는 전체적인 생산 공정의 생산기에 특히 중요하다.
- [0083] 대부분의 실험에서, 낮은 양에 불과한 염화콜린과 조합된 더 높은 농도의 선택된 아미노산을 포함하는 통상적인 생산 배지와 비교했을 때 본 발명에 따른 세포 배양 배지에 의해 심지어 더 양호한 성능 파라미터가 달성된다는 것이 밝혀졌다.
- [0084] 특정 이론에 제한되지 않으면서, 인지질 전구체인 콜린의 농도가 필수 세포막 성분인 포스파티딜콜린의 양에 연관되는 것으로 가정되고, 이러한 포스파티딜콜린은, 다른 인지질에 더하여, 세포막의 통합성 및 기능성을 보존하는데 필요하다. 콜린이 필수적이지 않은 배지 성분이고 세포가 이를 독립적으로 합성할 수 있다더라도, 콜린 함량이 낮은 배지에서 성장 중인 세포는 배양 공정 동안 이 물질이 제한되고, 그에 따라 포스파티딜콜린이 제한되는 것으로 가정될 수 있다. 그러나, 제한된 양의 콜린이 충분한 양의 포스파티딜콜린을 생산하는데 이용가능한 이유가 불활성이거나 제한된 경우때문일 수 있다. 이는 막, 특히 소포체 및 골지 복합체의 막의 "비정상적인" 조성을 초래할 수 있다. 이는 이러한 막들의 기능에 부정적으로 영향을 미칠 수 있고 세포 내의 폴리펩티드 발현을 또는 폴리펩티드 운반을 감소시킬 수 있다. 포스파티딜콜린이 결핍된 CHO 세포에서 골지 복합체로부터 형질막으로의 폴리펩티드 운반이 억제되는 것이 문헌 [Testerink et al., 2009; Journal of Lipid Research, Vol 50, 2182-2192]에서 나타났다. 이러한 결함은 외인성 포스파티딜콜린의 첨가에 의해 구조될 수 있다.
- [0085] 여러 중요한 이점이 본 발명에 따른 세포 배양 배지의 특이적인 조성으로부터 발생된다.
- [0086] 첫째, 본 발명에 따른 세포 배양 배지 내의 총 아미노산 함량의 감소가 세포 성장, 생존 세포 밀도, 뿐만 아니라 폴리펩티드 생산성의 관점에서 유사한 또는 심지어 개선된 기술적 성능 파라미터로 세포 배양 방법을 수행하는 것을 허용하는 한편, 동시에, 세포 배양물 내의 총 아미노산 함량 또는 일부 선택된 아미노산의 함량의 감소가 세포 배양 배지에 관한 한 비용 감소로 인해 생산 방법의 더 양호한 전체적인 경제 수지를 초래한다.
- [0087] 둘째, 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 세포 배양 배지 내에 함유된 성분들, 특히 비교적 높은 농도로 배지 내에 함유된 소수성 아미노산의 침전 위험을 방지한다. 이는 배지 보관 동안 특히 유리하다. 이러한 성분들에 대해, 감소된 농도는 세포 성장 및 폴리펩티드 생산 동안 필수 물질의 공급의 악화를 방지하는 것을 돕는다. 이는 전체적인 생산 공정의 생산기 동안에 특히 이롭다.
- [0088] 셋째, 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 더 높은 품질의 재조합 폴리펩티드의 생산을 허용한다. 형성된 폴리펩티드의 응집이 감소되고, 세포가 번역후 변형이 더 양호한 폴리펩티드를 생산할 수 있으며, 글리코실화 패턴이 또한 개선된다.
- [0089] 재조합 발현 동안의 형성된 폴리펩티드의 응집은 감소된 생성물 수율에 이르는 기술적인 문제점이다. 또한, 응

집은 기능적으로 활성인 폴리펩티드 생성물을 정제하는 것을 더욱 어렵게 한다.

- [0090] 따라서, 형성된 폴리펩티드 생성물의 응집을 실제 생산 공정 동안 가능한 한 많이 감소시키는 것이 바람직하다. 전형적인 생산 배지와 비교했을 때 본 발명에 따른 세포 배양 배지가 재조합 폴리펩티드 생성물의 감소된 응집을 초래한다는 것이 발견되었다.
- [0091] 다수의 폴리펩티드가 번역후 변형, 특히 폴리펩티드 글리코실화에 적용된다. 생성된 폴리펩티드는 공유결합으로 연결된 올리고사카라이드 사슬을 포함한다. 글리코실화는 폴리펩티드 기능성의 중요한 매개물로서 공지되어 있다. 따라서, 재조합 폴리펩티드 생산에 사용된 숙주 세포 시스템의 내인성 글리코실화 구조를 정확하게 모방하는 능력이 생성물 품질의 중요한 측면이다. 재조합 폴리펩티드의 치료 효율은 부정확하게 글리코실화된 폴리펩티드의 투여 후의 감소된 생체내 반감기 및 면역원성 성질로 인해 부적절한 폴리펩티드 글리코실화에 강하게 영향을 받을 수 있다.
- [0092] 일반적으로, 만노실화가 재조합 폴리펩티드 생산에서, 특히 재조합 항체 분야에서, 결정적인 측면으로 간주된다. 폴리펩티드의 고-만노실화를 방지하는 것이 재조합 폴리펩티드 생산에서의 일반적인 목표이다. 따라서, 재조합 폴리펩티드의 생산 동안 고-만노실화를 가능한 한 많이 감소시키는 것이 중요한 목표이다.
- [0093] 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 고-만노실화 정도가 매우 낮은 재조합 폴리펩티드를 생산하게 한다. 이러한 기술적 효과는 전형적인 생산 배지에 관하여 특히 유의하다. 예를 들어, 본 발명에 따른 세포 배양 배지를 사용하는 발현으로부터 수득된 재조합 폴리펩티드의 총량 중 고-만노실화의 고-만노실화 재조합 폴리펩티드의 상대적인 양은 생산 배지와 비교하여 바람직하게는 약 50%만큼 저하된다.
- [0094] 추가로, 본 발명에 따른 세포 배양 배지를 사용함으로써 수득된 재조합 폴리펩티드가 통상적인 성장 배지 또는 생산 배지를 사용함으로써 수득된 상응하는 폴리펩티드에 비해  $\beta$ -갈락토실화 백분율이 더 높다는 것이 놀랍게도 발견되었다.
- [0095] 콜린 농도가 높은 배지의 추가적인 이점은 생산기 및 확장기용으로 오직 1개의 배지를 가질 수 있게 함으로써 시간 및 자원을 절약시킨다는 것이다.
- [0096] **실시예**
- [0097] 하기의 실험들은 본 출원에서 정의된 바와 같은 본 발명을 추가로 설명하도록 의도된다.
- [0098] 세포 배양 배지의 설명
- [0099] 하기의 3가지 배지를 시험하였다:
- [0100] 저-콜린 성장 배지, 즉 염화콜린 함량이 40 mg/ℓ 인 배지 (대조군 1);
- [0101] 생산 배지 (대조군 2);
- [0102] 고-콜린 성장 배지, 즉 200 mg/ℓ 의 추가량의 염화콜린이 보충되어 총 염화콜린 함량이 240 mg/ℓ 가 된 저-콜린 성장 배지.
- [0103] 처음 2개의 배지 (저-콜린 성장 배지 및 생산 배지)는 비교 목적으로만 사용되었고, 염화콜린 함량이 높은 세 번째 배지가 본 발명에 따른 배지를 나타낸다.
- [0104] 저-콜린 성장 배지는 세포 배양물의 성장 및 증식용으로 디자인된 전형적인 배지이다. 이러한 배지는 대규모 폴리펩티드 생산에 대한 중요한 요건인 높은 세포 밀도에 도달할 때까지 세포를 배양하는 것을 허용한다. 그러나, 51.1 mmol/ℓ 의 배지 내의 총 아미노산 농도를 고려하여 다수의 아미노산의 함량이 저도 내지 중간 정도이기 때문에, 저-콜린 성장 배지는 세포 배양물로부터의 폴리펩티드 생산용으로 디자인되지 않는다.

[0105] 저-콜린 성장 배지의 아미노산 조성은 하기와 같다:

아미노산	배지 1 ℓ 당 mg	농도 (mmol/L)
L-아르기닌, HCl	1053	5.0
L-아스파라긴 1수화물	616	4.1
L-아스파르트산	461	3.5
글리신	38	0.5
L-히스티딘 HCl H <sub>2</sub> O	168	0.8
L-이소류신	394	3.0
L-류신	500	3.8
L-리신 HCl	622	3.4
L-메티오닌	180	1.2
L-페닐알라닌	264	1.6
L-프롤린	368	3.2
L-세린	432	4.1
L-트레오닌	334	2.8
L-트립토판	102	0.5
L-발린	375	3.2
L-글루타민	1170	8.0
L-티로신	278*)	1.5
L-시스틴	200*)	0.8
총 함량		51.0

\*) L-티로신 및 L-시스틴은 상기에 지시된 티로신 및 시스틴 농도를 달성하기 위해 원액을 사용하여 저-콜린 성장 배지에 첨가된다.

[0106]

[0107] 저-콜린 성장 배지에 대조적으로, 제2 배지 (생산 배지)는 세포 배양물을 사용하는 대규모 폴리펩티드 생산에 유용한 배지이다. 이러한 생산 배지는 저-콜린 성장 배지에 비교했을 때 대부분의 아미노산을 더 높은 양으로 함유하지만 (배지 내의 총 아미노산 농도가 90.50 mmol/ℓ 임), 기타 성분들의 양은 기본적으로 동일하다.



[0108] 사용된 생산 배지의 아미노산 조성은 하기와 같다:

아미노산	배지 1 ℓ 당 mg	농도 (mmol/L)
L-아르기닌, HCl	1053	5.0
L-아스파라긴 1수화물	1501	10.0
L-아스파르트산	461	3.5
글리신	38	0.5
L-히스티딘 HCl H <sub>2</sub> O	268	1.3
L-이소류신	894	6.8
L-류신	1200	9.2
L-리신 HCl	822	4.5
L-메티오닌	280	1.9
L-페닐알라닌	464	2.8
L-프롤린	968	8.4
L-세린	1232	11.7
L-트레오닌	534	4.5
L-트립토판	252	1.2
L-발린	776	6.6
L-글루타민	1169	8.0
L-글루탐산 Na-염 수화물	182	1.2
L-티로신	423*)	2.3
L-시스틴	305*)	1.3
총 함량		90.7

[0109]

[0110] 이러한 비교용 생산 배지 내의 염화콜린 함량 또한 저-콜린 성장 배지보다 유의하게 더 높다. 종래 기술로부터의 공지된 생산 배지는 일반적으로 훨씬 더 낮은 양의 염화콜린을 함유한다는 것을 지지하는 것이 중요하다. 따라서, 비교용 생산 배지에서의 높은 염화콜린 함량은 일반적으로는 공지된 성장 배지와 염화콜린 함량 면에서 상이하지 않은 종래 기술로부터의 공지된 생산 배지에 대한 중요한 차이점으로 간주되어야 한다.

[0111] 세 번째 배지는 고-콜린 성장 배지, 즉 200 mg/ℓ의 염화콜린이 보충되어 전체적인 염화콜린 함량이 240 mg/ℓ가 된 저-콜린 성장 배지로 표시되는, 본 발명에 따른 배지이다. 더 높은 염화콜린 함량을 제외하면, 본 발명에 따른 세 번째 배지는 여전히 전형적인 성장 배지로 간주될 수 있을 것이다.

[0112] 실시예는 생산기 동안 사용되었을 때 저-콜린 성장 배지 등의 성장 배지 내의 높은 염화콜린 양에 의해 달성된 현저한 개선을 실연하는데, 이는 염화콜린 함량이 높은 이같은 성장 배지를 낮은 염화콜린이 보충된 배지보다 세포 성장, 세포 생존율 및 폴리펩티드 역가의 관점에서 매우 우월하게 할 뿐만 아니라, 또한 심지어 염화콜린 양이 동등하게 높은 생산 배지보다 동일한 측면에서 우월하게 한다. 더 높은 양의 염화콜린을 첨가하는 것은 정상적인 성장 배지에서 더 양호한 세포 성장 및 생존율 및 개선된 폴리펩티드 역가를 달성하는 것을 돕는다.

[0113] 실험 구성

[0114] 실험을 위해, dhfr (+) CHO-K1 세포주 ATCC CCL-61 (문헌 [Kao et al., Genetics, 1967, 55, 513-524]; [Kao et al., PNAS, 1968, 60, 1275-1281]; [Puck et al., J. Exp. Med., 1958, 108, 945-959])로부터 무혈청의 무단백질 배지 조건에 대한 적합화에 의해 유래된 모(parental) CHO 세포주를 사용하였다. 이러한 모 세포주의 3개의 분취량을 형질감염시켜 3가지 상이한 모노클로날 항체인 mAb1, mAb2, mAb3을 각각 발현하도록 하였다.

[0115] 진탕 플라스크 실험 (실험 1 내지 3)

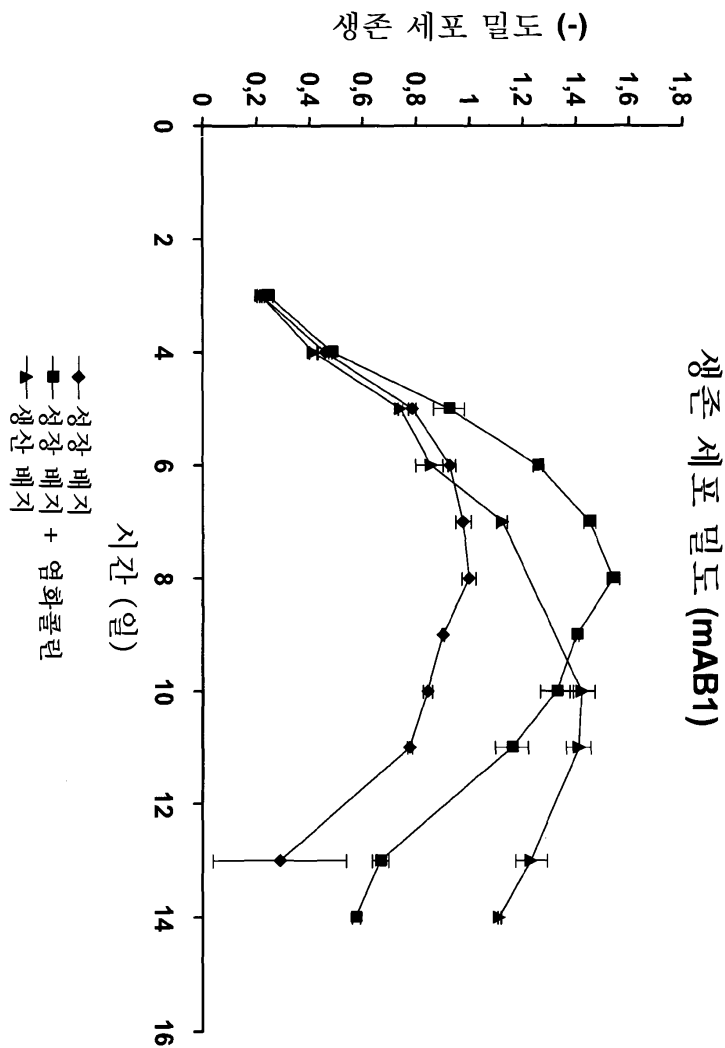
[0116] 모두 9개의 진탕 플라스크 (각각의 실험에 대해 3개)를 배지를 제외하고는 동일한 조건 하에 실행시켰다. 조건은 하기를 수반하였다: 1일당 초기 배양물 부피의 2 및 0.4%의 공급율로 제3일 및 제5일에 시작되는 2개의 일일 볼루스(bolus) 공급물로의 유가식 배양; 제5일에 온도를 36.5℃에서 33℃로 변환시킴; 인큐베이터 내의 10% CO<sub>2</sub>; 150 rpm의 진탕 속도 (회전(stroke) 반경 = 25 mm). 세포 성장 / 세포의 생존율, 뿐만 아니라 발현된 재조합 항체의 결과적인 역가를 결정하였다.

- [0117] a) 실험 1
- [0118] 도 1 및 2는 세포 성장 및 생존율의 관점에서 실험 1에서 배양된 mAb1을 발현하는 세포에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0119] 도 1 및 2에 도해진 바와 같이, 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 배지 (고-콜린 성장 배지)는 염화콜린 함량이 낮은 저-콜린 성장 배지와 비교했을 때 최대 생존 세포 밀도에서의 53% 증가 및 생존율의 더 낮은 감소를 나타냈다.
- [0120] 도 3은 폴리펩티드 역가의 관점에서 실험 1에서 배양된 세포에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0121] 도 3에 도해진 바와 같이, 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 배지 (고-콜린 성장 배지)에서 수득된 재조합 항체의 폴리펩티드 역가는 낮은 함량에 불과한 염화콜린을 가지며 전형적인 성장 배지만을 나타내는 저-콜린 성장 배지와 비교하여 제13일에 330%의 폴리펩티드 역가 증가를 나타냈다.
- [0122] 도 3은 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 배지가 심지어 생산 배지로부터 수득된 역가보다 약간 더 높은 폴리펩티드 역가를 달성할 수 있게 한다는 것을 또한 나타낸다.
- [0123] b) 실험 2
- [0124] 도 4 및 5는 세포 성장 및 생존율의 관점에서 실험 2에서 배양된 mAb2를 발현하는 세포에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0125] 도 4 및 5에 도해진 바와 같이, 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 배지 (고-콜린 성장 배지)는 낮은 함량에 불과한 염화콜린을 갖는 저-콜린 성장 배지와 비교했을 때 세포 성장에 대한 영향이 작았지만, 공정 말기에 유의하게 더 높은 생존율을 제공하였다.
- [0126] 도 6은 폴리펩티드 역가의 관점에서 실험 2에서 배양된 세포에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0127] 도 6은 저-콜린 성장 배지에 비교했을 때 본 발명에 따른 세포 배양 배지에 대해 제11일에 폴리펩티드 역가의 85% 증가를 나타낸다. 추가로, 염화콜린 함량이 동등하게 높은 생산 배지에서 수득된 폴리펩티드 역가와 비교했을 때 본 발명에 따른 세포 배양 배지에서 수득된 폴리펩티드 역가가 심지어 더 높았다.
- [0128] c) 실험 3
- [0129] 도 7 및 8은 세포 성장 및 생존율의 관점에서 실험 3에서 배양된 mAb3을 발현하는 세포에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0130] 도 7 및 8에 도해진 바와 같이, 낮은 양에 불과한 염화콜린을 포함하는 비교용 세포 배양 배지 (저-콜린 성장 배지)와 비교했을 때 본 발명에 따른 배지에 의해 배양 공정 말기의 더 높은 세포 생존율이 수득되었다.
- [0131] 도 9는 폴리펩티드 역가의 관점에서 실험 3에서 배양된 세포에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0132] 도 9는 본 발명에 따른 세포 배양 배지에서 수득된 폴리펩티드 역가가 비교용 배지인 저-콜린 성장 배지와 비교했을 때 제11일에 145%만큼 증가된다는 것을 나타낸다. 본 발명에 따른 세포 배양 배지의 경우 폴리펩티드 역가는 심지어 염화콜린 함량이 높은 생산 배지를 사용함으로써 수득된 역가보다 약간 더 높았다.
- [0133] 염화콜린의 표준량이 240 mg/l 인 생산 배지의 사용과 비교했을 때 생산 배지에서 더 높은 농도의 염화콜린을 사용하는 것이 개선된 세포 성장 또는 폴리펩티드 역가를 초래하지 않았다는 것이 추가로 실험에 의해 입증되었다.
- [0134] 하기의 추가적인 실험은 폴리펩티드 생성물 품질에 대한 세포 배양 배지의 영향을 결정하기 위해 수행되었다. 특히, 응집 및 글리코실화에 대한 배지의 영향을 결정하기 위해 생성물을 분석하였다.
- [0135] 도 10은 재조합 항체의 총량과 비교하여, 재조합 항체 생성물의 응집을 %를 나타낸다. 본 발명에 따른 세포 배양 배지에서의 응집율은 생산 배지에 비해 30% 초과만큼 감소되었다.
- [0136] 여러 세포 배양 배지에서의 mAb3 발현에 이은 재조합 항체의 글리코실화 패턴의 분석은 염화콜린 함량이 높은 본 발명에 따른 성장 배지가 고-만노실화 (원치 않는 글리코실화 패턴을 나타냄)를 포함하는 재조합 생성물의 총량이 낮은 재조합 항체를 초래하였음을 나타냈다. 본 발명에 따른 배지를 사용하는 것은 생산 배지를 사용하는 것과 비교하여 고-만노실화의 관점에서 55%를 초과하는 감소를 초래하였다.

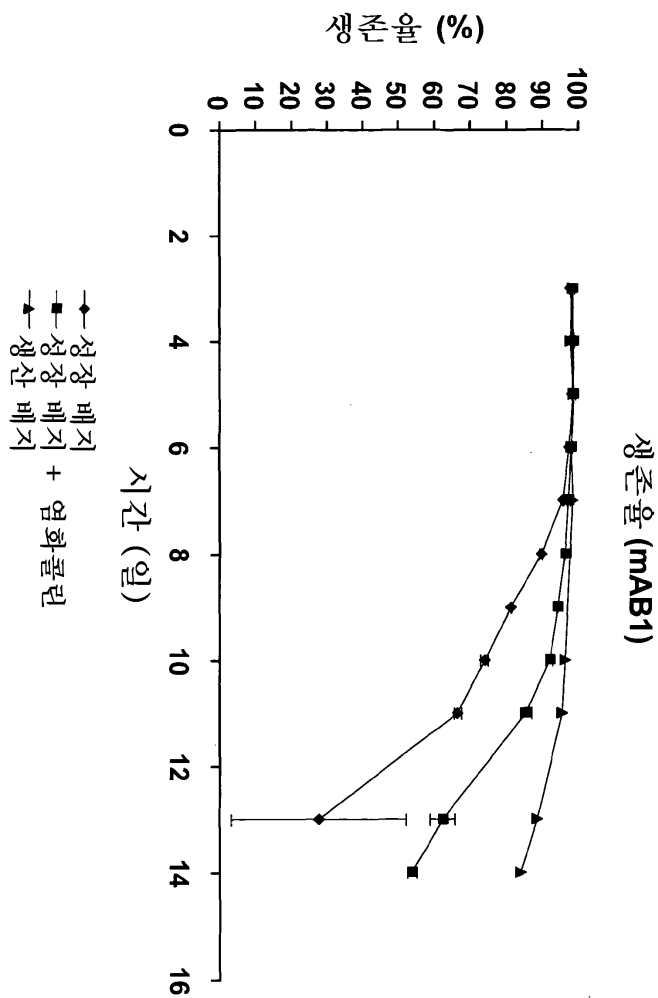
- [0137] 생물반응기 유가식 실행 (실험 4)
- [0138] 하기의 실험은 생물반응기에서의 유가식 실행이다. 이는 상기 실험 3에 상응한다. mAb3을 발현하는 세포를 사용하였다. 조건은 하기와 같았다: 2 ℓ 출발 부피; 1일당 초기 배양물 부피의 2 및 0.4%의 공급율로 제3일 및 제5일에 시작된 2개의 상이한 공급 용액의 연속 공급; 제5일에 온도를 36.5℃에서 33℃로 변환시킴;  $pO_2$  = 30%; pH = 6.9 (불감대(deadband) 0.1);  $CO_2$  및 0.5M NaOH로 제어; 진탕 속도 = 300 rpm.
- [0139] 도 11 및 12는 생물반응기에서 유가식 실행으로 수행된 실험 4에서 생존 세포 밀도 및 세포의 생존율 백분율에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0140] 세포 성장 및 세포의 생존율에 관하여, 생물반응기에서의 유가식 실행으로부터의 결과는 진탕 플라스크 실험에서 수득된 결과와 일치하였다. 즉, 기본적으로 생물반응기에서의 유가식 실행이 진탕 플라스크 실험에서 수득된 결과를 확증하였다.
- [0141] 진탕 플라스크 실험에서와 같이, 생산 배지에서 달성된 피크(peak) 생존 세포 밀도가 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 세포 배양 배지 (고-콜린 성장 배지)와 비교하여 약간 더 높았다. 그러나, 낮은 함량에 불과한 염화콜린을 갖는 미보충 성장 배지와 비교하여 본 발명의 세포 배양 배지, 즉 높은 함량의 염화콜린이 보충된 배지가 사용되었을 때 생존율의 백분율이 유의하게 더 높은 수준에서 유지되었다.
- [0142] 도 13은 생물반응기에서의 유가식 실행으로 수행된 실험 4에서 폴리펩티드 역가에 대해 수득된 결과를 나타낸다.
- [0143] 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 세포 배양 배지에 대해 제11일에 측정된 폴리펩티드 역가가 낮은 양에 불과한 염화콜린을 갖는 비교용 성장 배지와 비교했을 때 170% 만큼 증가되었다.
- [0144] 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 세포 배양 배지에 대해 수득된 폴리펩티드 역가는 진탕 플라스크 실험에서 비교 목적으로 생산 배지를 사용하여 수득된 폴리펩티드 역가보다 심지어 더 우월했던 한편, 생물반응기에서의 유가식 실행에서의 실험은 생산 배지와 비교했을 때 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 세포 배양 배지에서 약간 더 낮은 폴리펩티드 역가를 나타냈다. 그럼에도 불구하고, 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 세포 배양 배지를 사용함으로써 생물반응기에서 수득된 폴리펩티드 역가는 매우 높았고, 여전히 비교 목적으로 생산 배지를 사용하여 수득된 폴리펩티드 역가에 필적하는 수준이었다.
- [0145] 생물반응기에서의 실험 4는, 염화콜린 함량이 높은 본 발명의 세포 배양 배지가, 각각의 세포 배양 배지에서 아미노산 총량 또는 선택된 아미노산의 양을 유의하게 감소시킬 수 있으면서 필적하는 폴리펩티드 역가를 달성하는 것을 허용하는 것에 의해 통상적인 생산 배지에 대한 적절한 대안을 나타낸다는 것을 추가로 확증한다.
- [0146] 또한 생물반응기에서의 실험 4는 전형적인 성장 배지 내의 염화콜린 함량의 증가가 이러한 성장 배지를 폴리펩티드 생산에 사용할 때 폴리펩티드 역가의 거대한 증가를 달성하는 것을 돕는다는 것을 한번 더 증명한다.
- [0147] 성장 배지에 대한 여러 농도의 염화콜린의 첨가
- [0148] 추가적인 실험 세트에서, 염화콜린을 다양한 농도 (총 40, 80, 120, 160, 200, 240, 500, 840, 1000, 3000 및 5000 mg/ℓ)로 분말 성장 배지에 첨가하였다. 이렇게 수득된 배지를, 일반적으로 상기에 개요된 바와 같이, mAb3 및 mAb4를 각각 생산하는데 사용하였다.
- [0149] 전체 배양 기간 (각각 13일, 17일)에 대한 mAb3에 대한 표준화된 항체 농도, 표준화된 생존 세포 밀도 및 생존율, 및 추가적으로 mAb4에 대해서는 표준화된 세포 특이적 생산성이 도 14 내지 도 24에서 추가로 도시된다.
- [0150] 이러한 데이터로부터 볼 수 있듯이, 13일 또는 17일 배양 후 생존율 및 항체 농도의 관점에서 가장 낮은 값이 염화콜린이 총 40 mg/ℓ 인 성장 배지에서 달성되었다. 3000 mg/ℓ 이상의 농도가 세포의 생존율에 부정적으로 영향을 미치지 않았지만, 세포가 이러한 배지에서 성장하지 않음에 따라, 항체 농도가 1 미만으로 유지되었다. 40 mg/ℓ 보다 높은 모든 콜린 농도에 대해 생존율이 더 높았다. 생존율에 대한 염화콜린의 농도 의존적 효과가 있는 것으로 보인다. 배지 내의 더 높은 염화콜린 농도는 배양 말기에 더 높은 생존율을 초래하였다.

도면

도면1

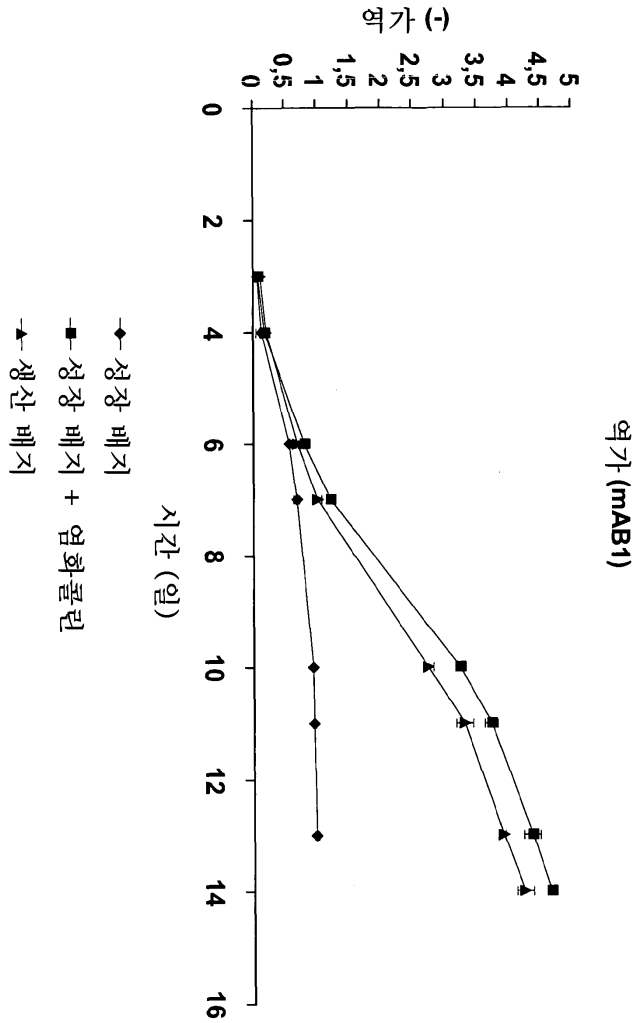


도면2

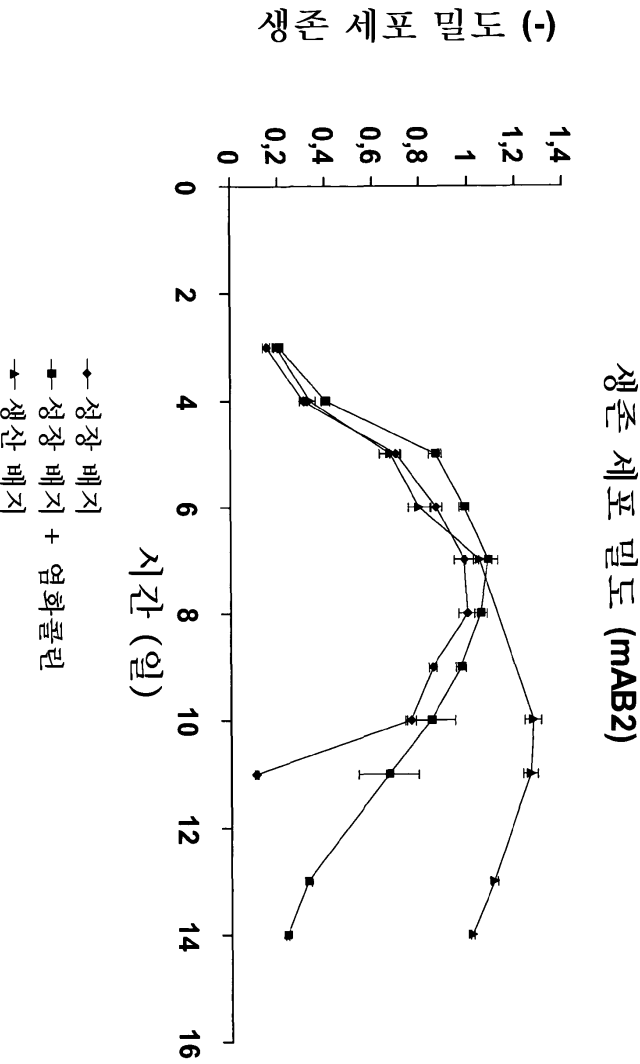




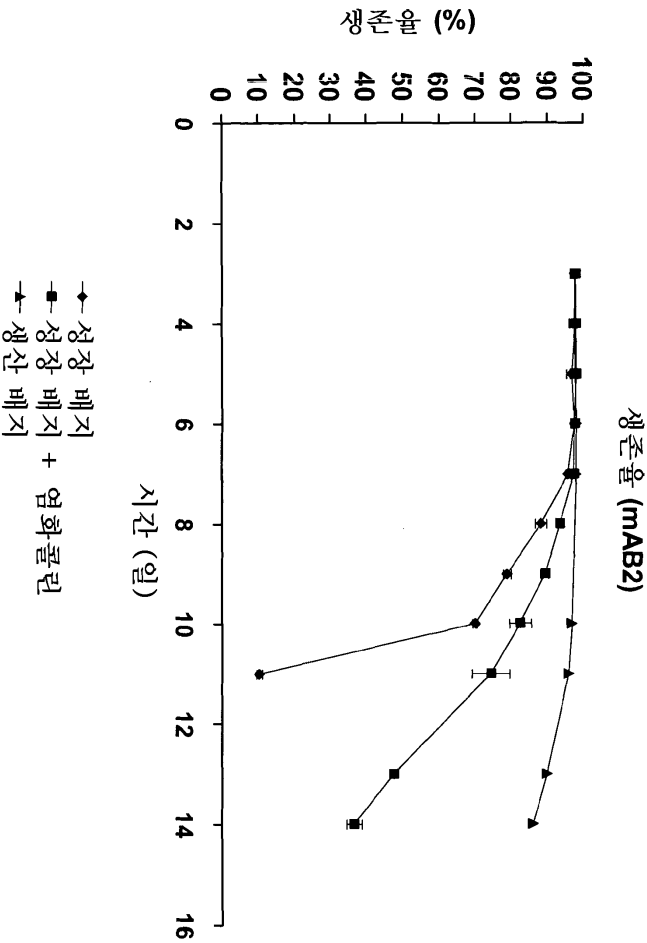
도면3



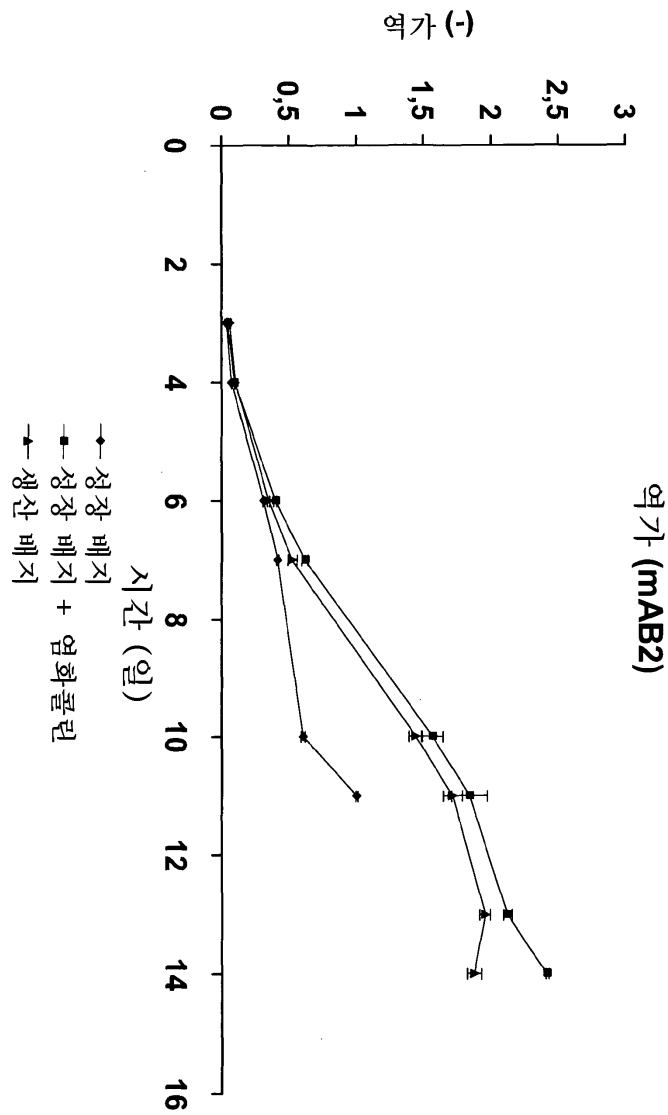
도면4



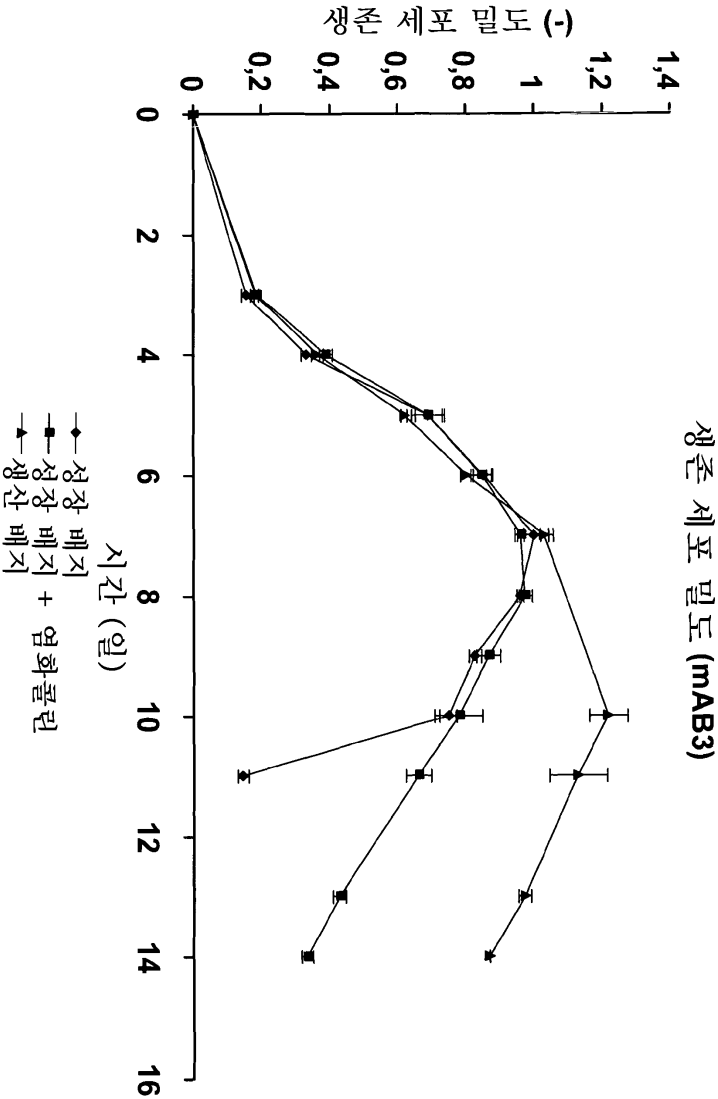
도면5



도면6

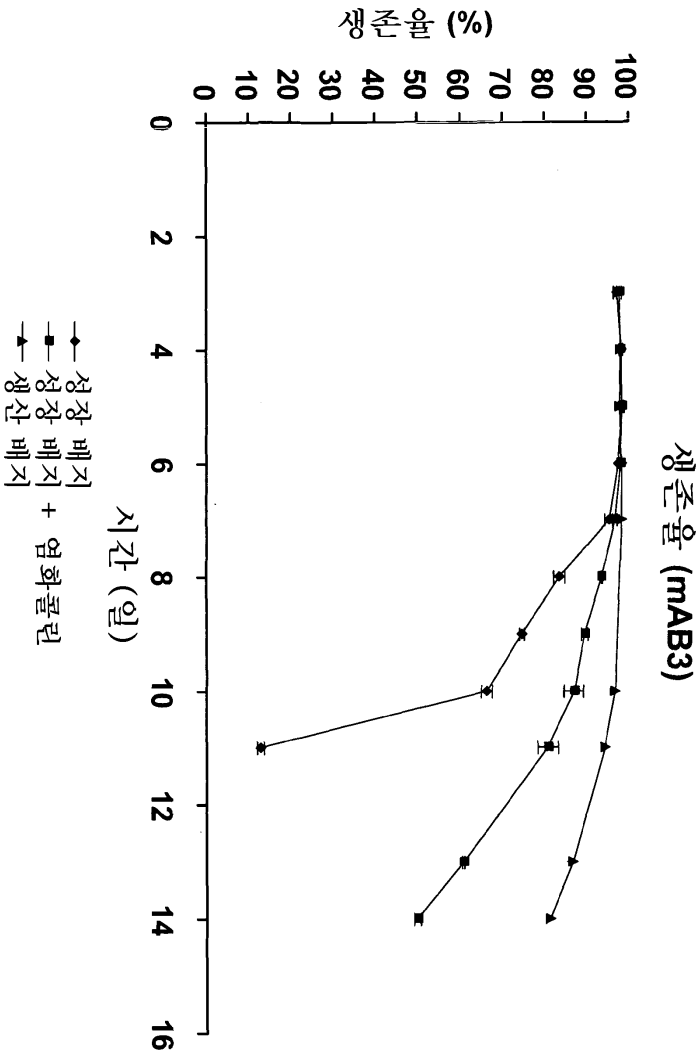


도면7

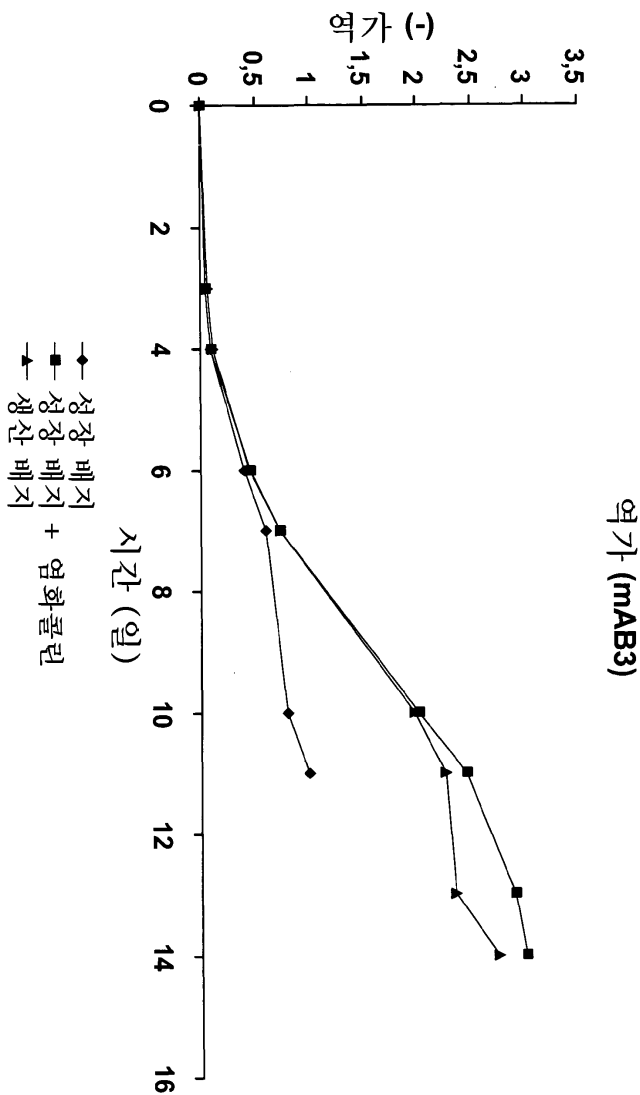




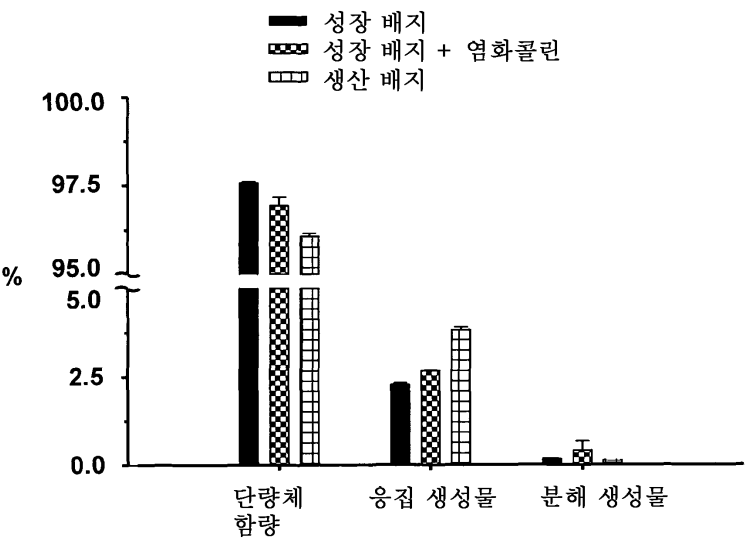
도면8



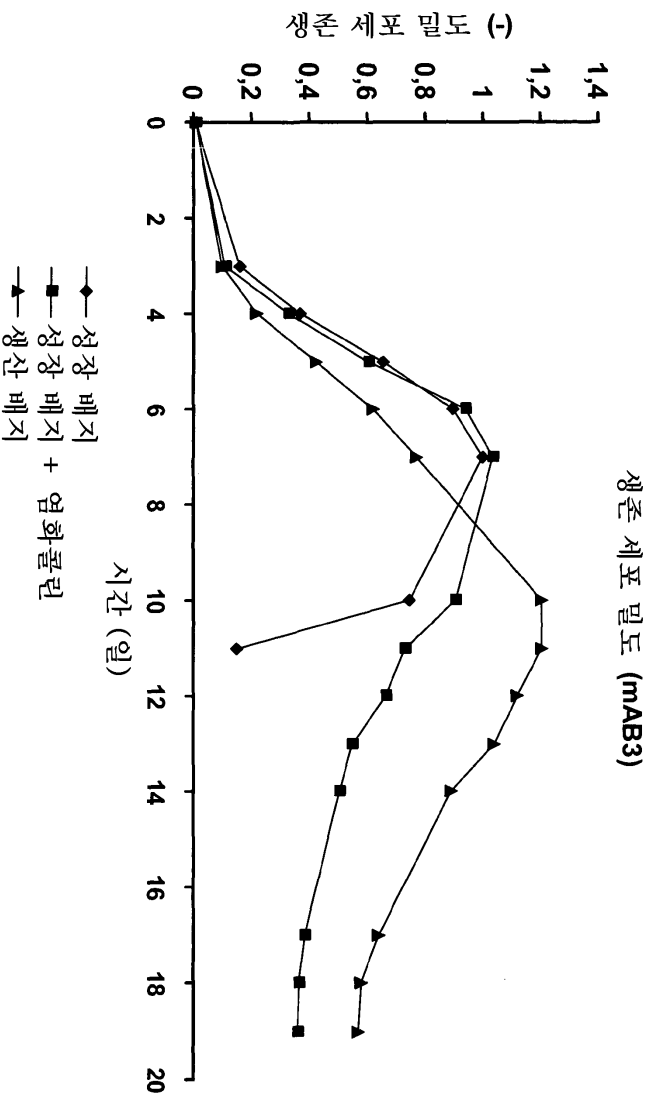
도면9



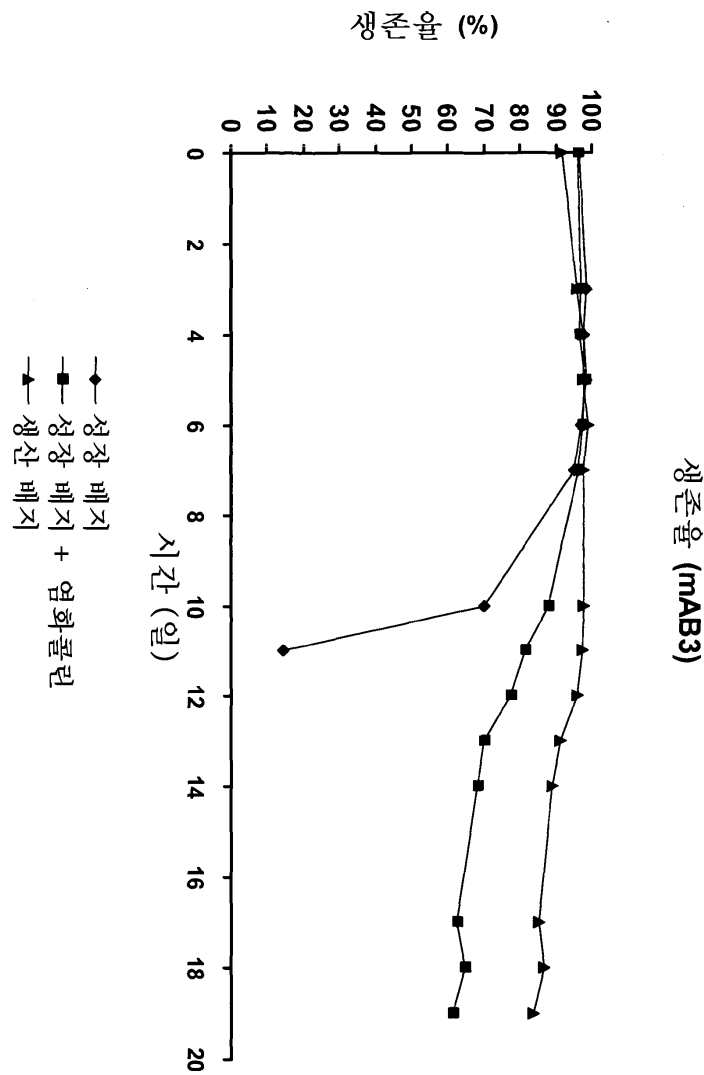
도면10



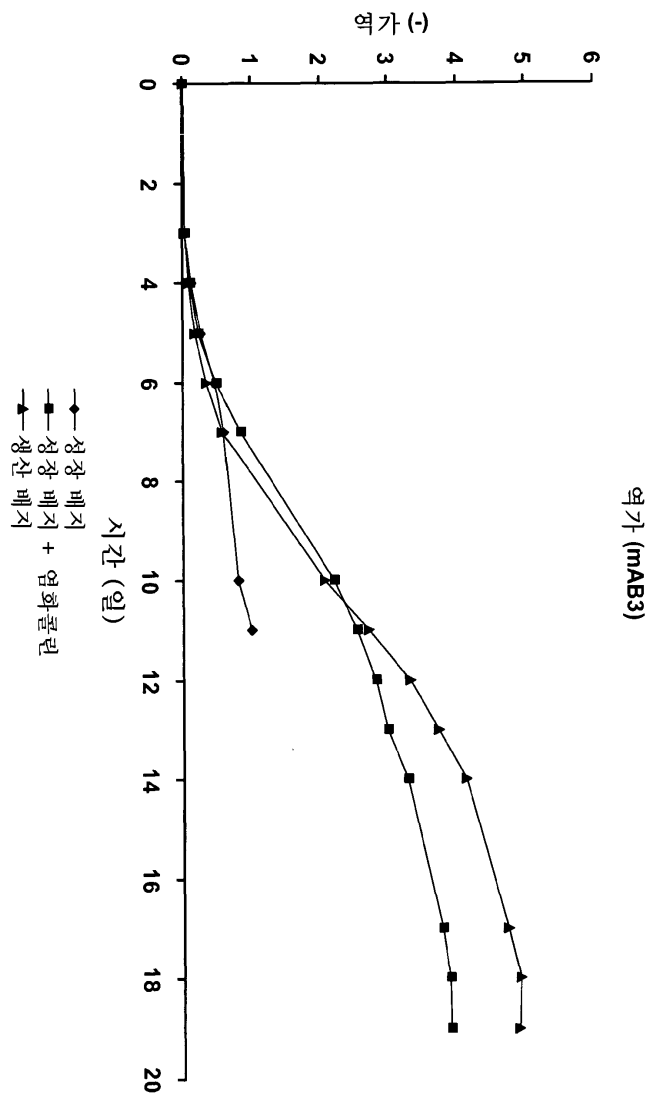
도면11



도면12

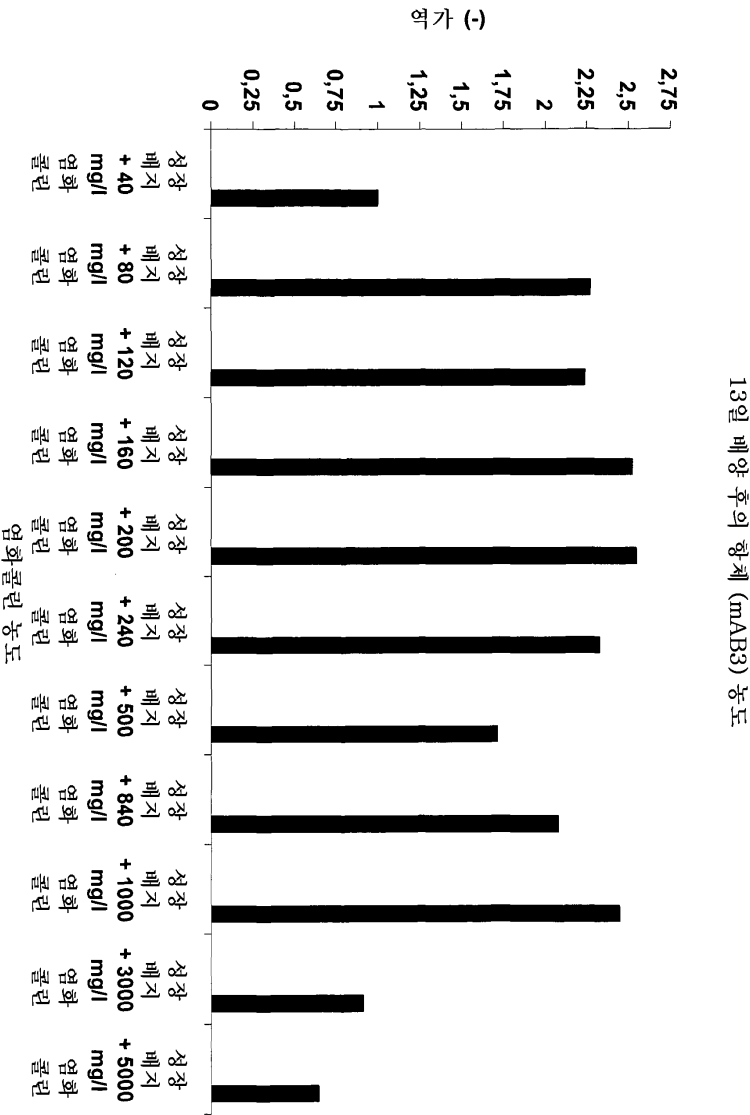


도면13

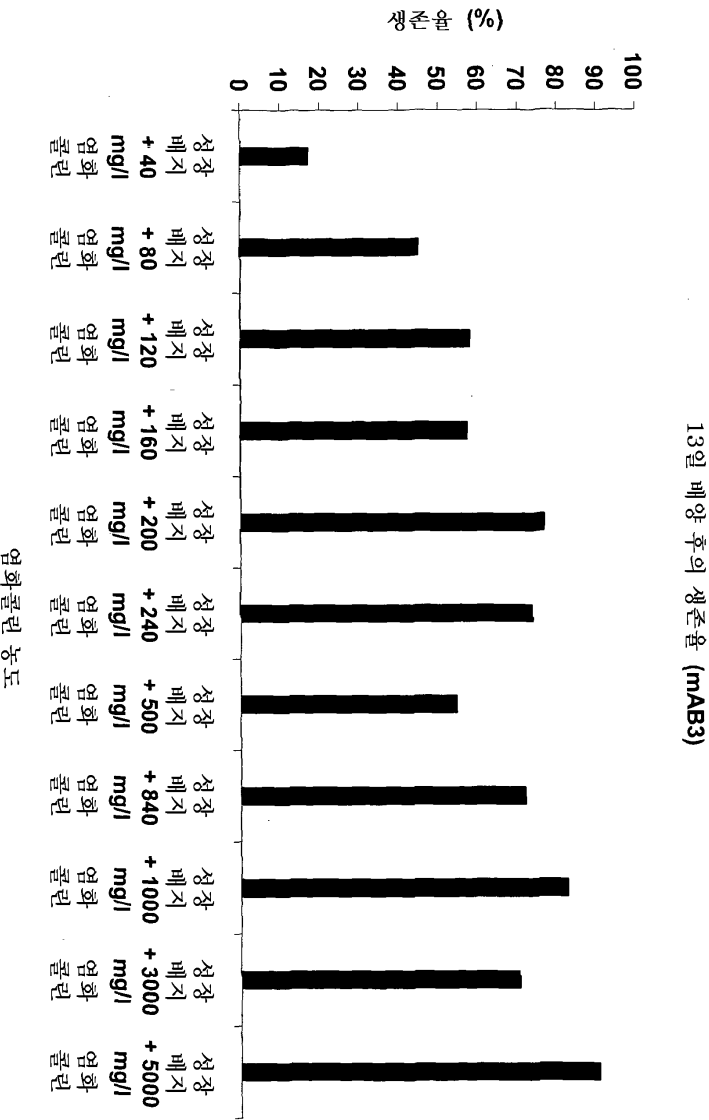




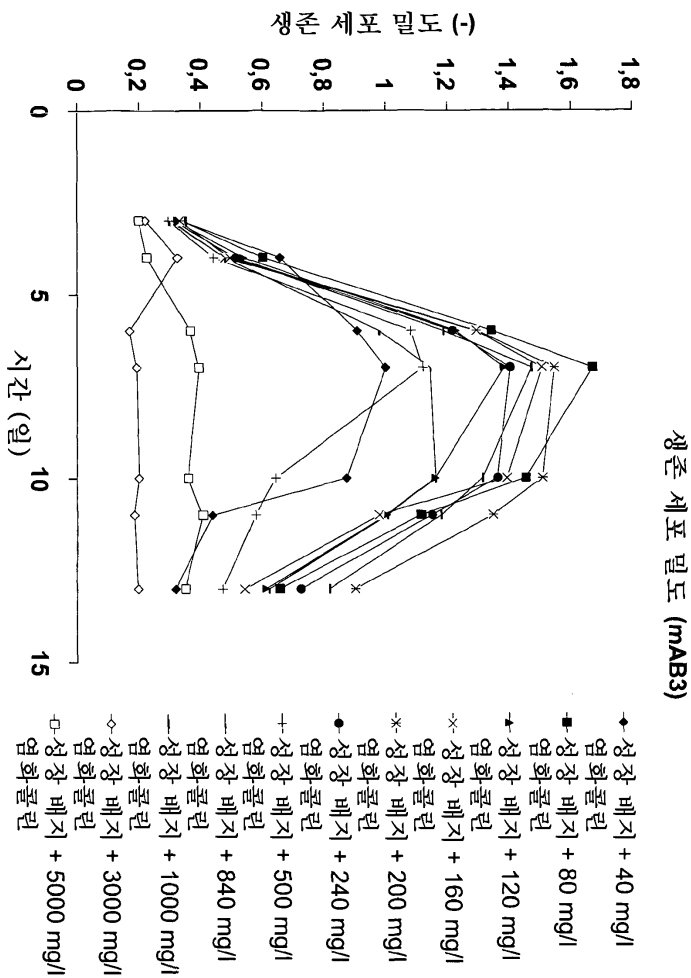
도면14



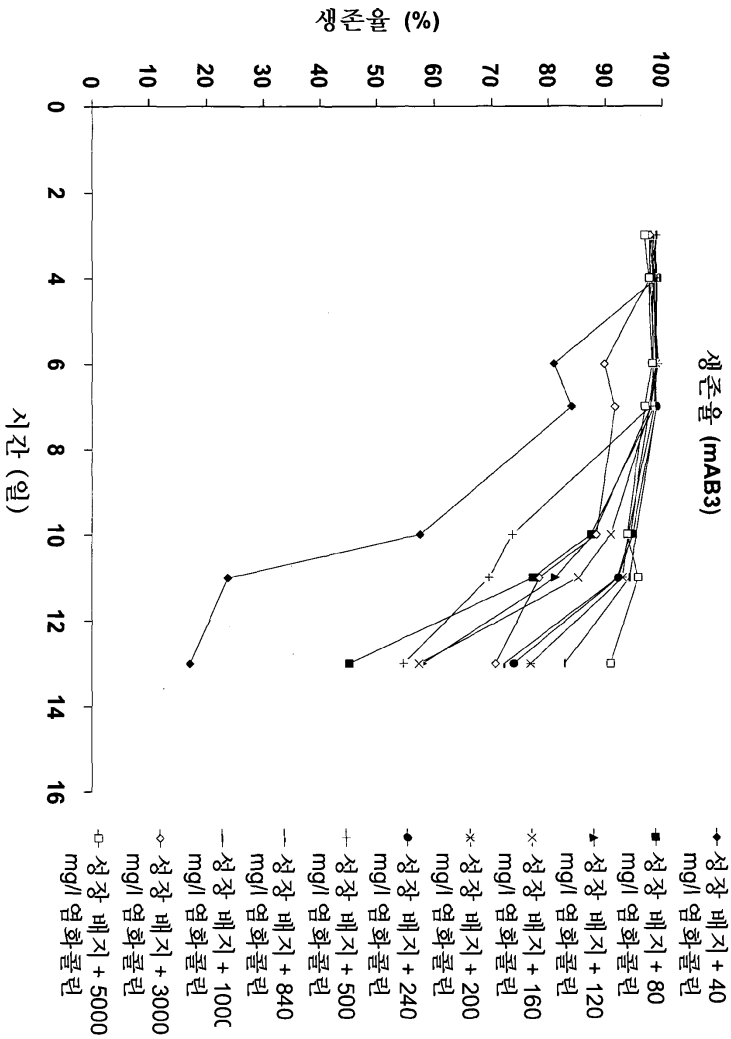
도면15



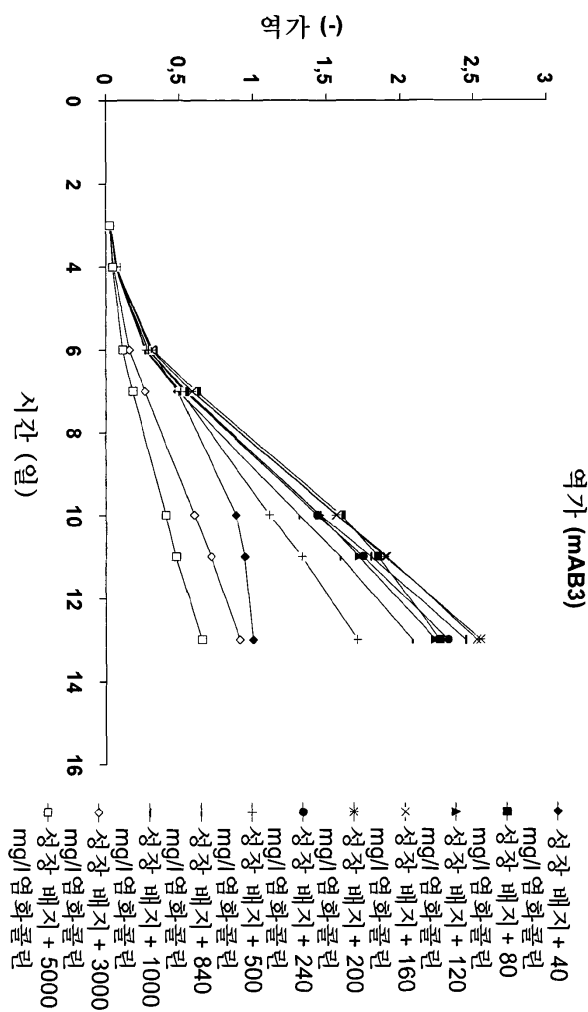
도면16



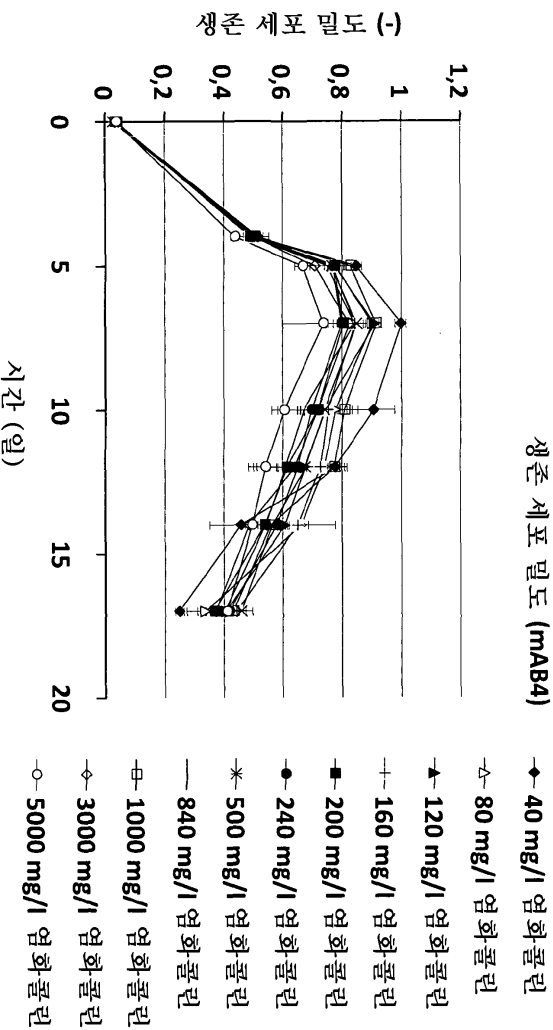
도면17



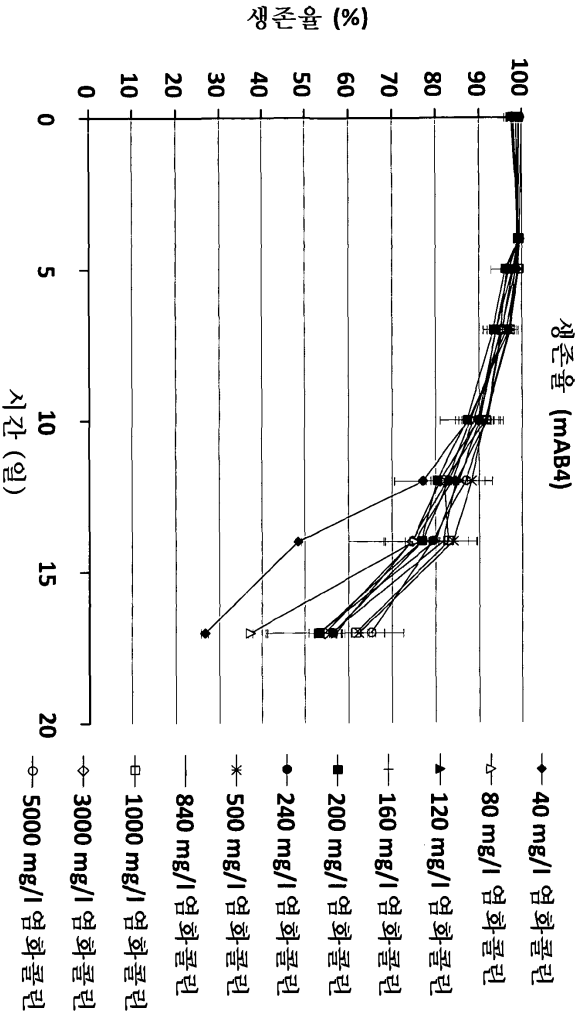
도면18



도면19

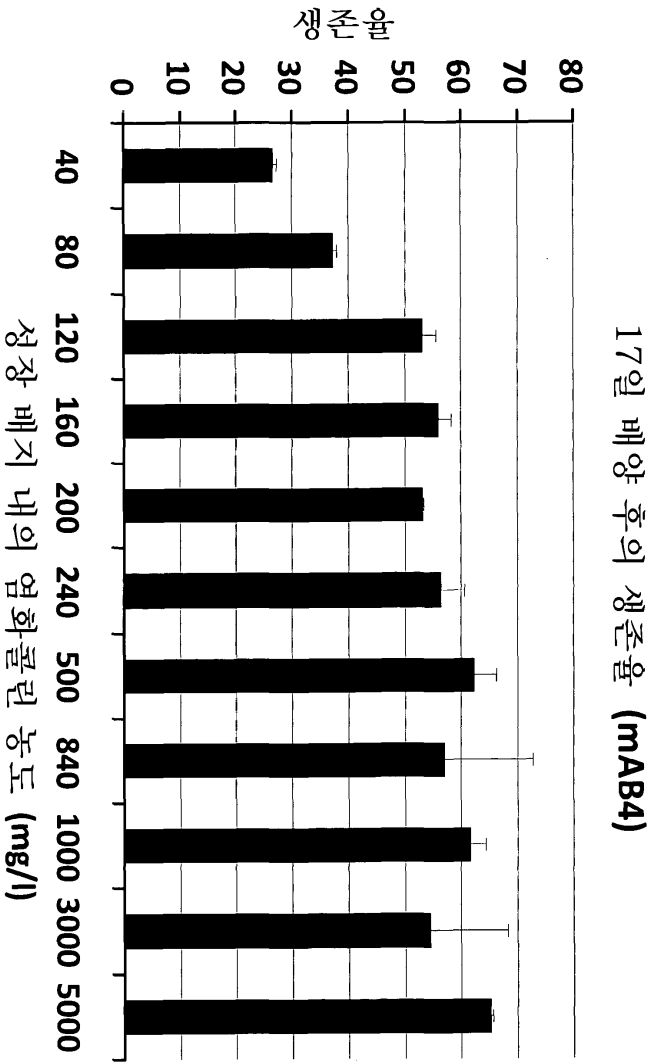


도면20

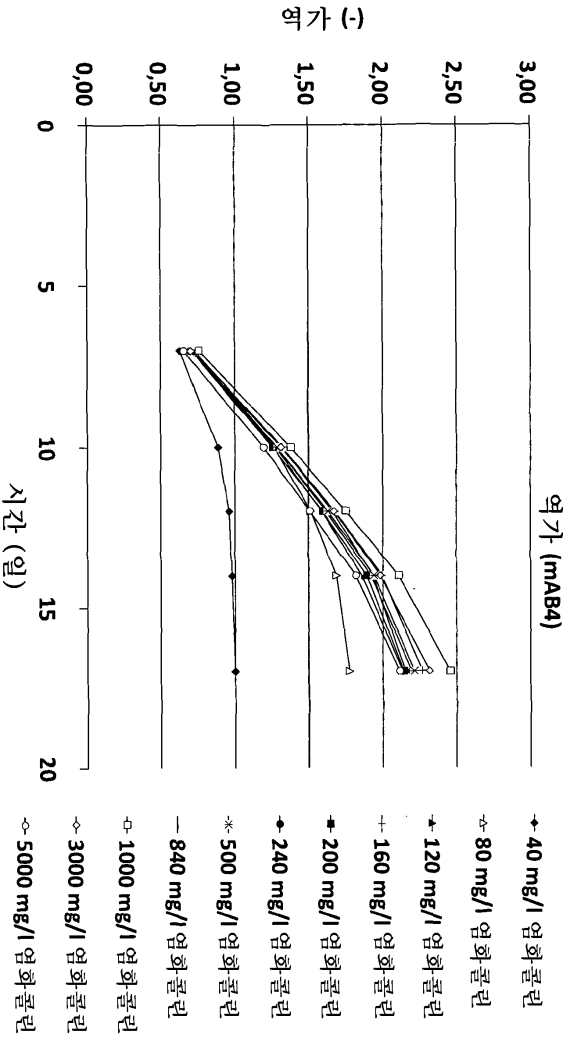




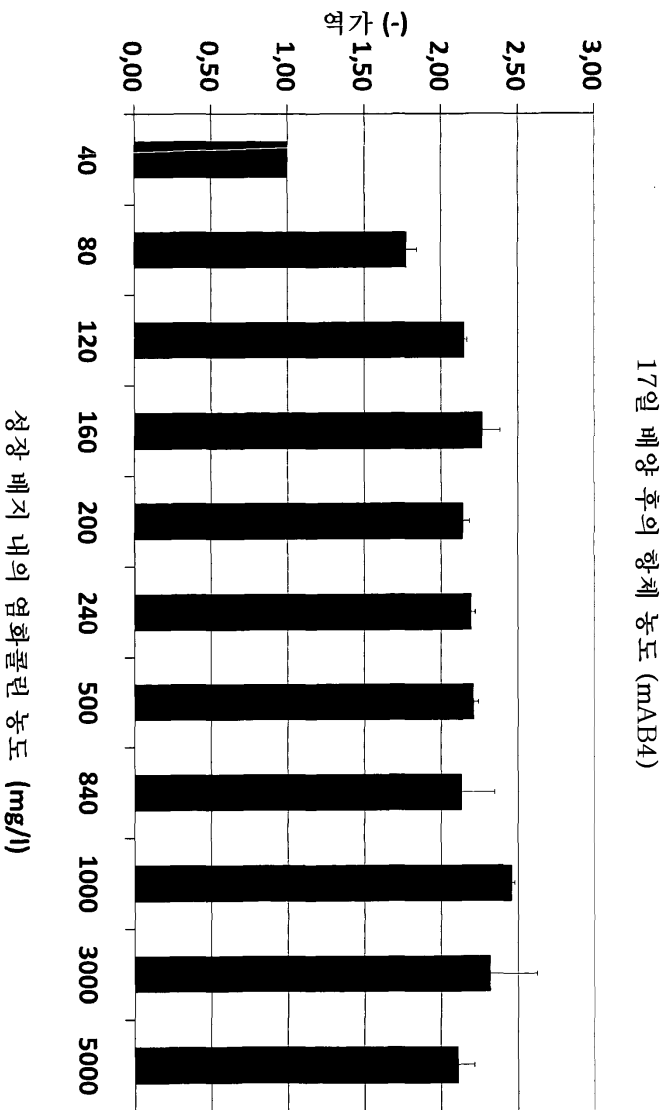
도면21



도면22



도면23



도면24

